

Desarrollo de una tinta de biomaterial a base de alginato, ácido hialurónico y plasma pobre en plaquetas como posible tratamiento para las úlceras crónicas de pie diabético

Presentado por:

Angie Daniela Fuentes Ramírez

Cristian David García Márquez

Diego Andrés Hormiga Ribero

Códigos:

U00121735

U00121990

U00125597

Director:

PhD. Víctor Alfonso Solarte David

Co-Director:

PhD. Silvia Milena Becerra Bayona

Universidad Autónoma de Bucaramanga

Facultad de Ingeniería

Programa De Ingeniería Biomédica

Bucaramanga

2022

Agradecimientos

A nuestros directores de proyecto de grado, PhD. Víctor Alfonso Solarte y PhD. Silvia Milena Becerra, por su constante apoyo y compromiso tanto con el presente proyecto como con cada uno de los integrantes de este, por creer en nuestro éxito, por guiarnos y por brindarnos consejos para ser mejores personas y profesionales. Muchas gracias por el tiempo invertido, siempre fueron y seguirán siendo, un gran ejemplo a seguir.

Todos los integrantes

A mis padres, por ayudarme y brindarme los recursos necesarios para poder culminar mi carrera. A mi hermana mayor, a mi tía y a la familia Suárez Cadena por su apoyo incondicional, por ser una gran guía y ejemplo a seguir.

Angie Daniela Fuentes Ramírez

Primero a dios, segundo a mis padres y a mis docentes PhD. Víctor Alfonso Solarte y PhD. Silvia Milena por brindarme siempre su apoyo.

Cristian David García Márquez

A mi familia, a mis docentes y a todo aquel que creyó en mí.

Diego Andrés Hormiga Ribero

Resumen

La diabetes se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial y junto a esta se han incrementado el desarrollo de derivaciones patológicas como es el caso de las úlceras crónicas de pie diabético. Las úlceras crónicas se caracterizan por su difícil cicatrización, llegando a necesitar meses e incluso años para cicatrizar. Debido a esto se buscan alternativas terapéuticas que permitan a la herida una correcta cicatrización y que además cumpla con la morfología específica de cada úlcera. Con este preámbulo nace el desarrollo de la tecnología de bioimpresión 3D y con ella las tintas de biomaterial, mediante las cuales se pueden imprimir apósitos personalizados y funcionalizados para cada úlcera, brindando una alternativa terapéutica para las úlceras crónicas de pie diabético. Con base a lo anterior, el proyecto se centró en el desarrollo de una tinta de biomaterial que presentará una correcta fidelidad de impresión utilizando biopolímeros como el Alginato (Alg), ácido hialurónico (AH) y Plasma pobre en plaquetas (PPP), biomateriales utilizados en el ámbito de la ingeniería de tejidos y la impresión 3D por sus propiedades regenerativas y mecánicas. Para lograr el objetivo de este proyecto, se realizaron pruebas que permitieron determinar los parámetros de impresión que permiten una correcta fidelidad de impresión, así como pruebas mecánicas y de degradación de la tinta de biomaterial evaluada. Los parámetros seleccionados para la impresión de la tinta de biomaterial son 0.25 mm en Load Before Printing, 4°C temperatura del dispensador, 30% en Fill Density y 0.7 mm en Retraction Distance, todos estos parámetros de la Bioimpresora Dr. In vivo 3D2. Estos parámetros junto a las concentraciones de 6.5% p/v de Alginato (Alg) para la tinta control (TC), de 6.5% p/v de Alg junto a 5% p/v de ácido hialurónico (AH) para la tinta seleccionada (TS) y el tiempo de reticulación en 1 h evidenciaron una correcta fidelidad de impresión. Seguido de esto, se caracterizaron mecánicamente las TC y TS. Se obtuvo un módulo de Young a compresión entre 175.59 kPa – 268.78 kPa para la TC sin hinchamiento en PBS, cuando se realizó el proceso de hinchamiento en PBS se obtuvieron valores entre 19.128 kPa – 33.834 kPa. Para la TS se

obtuvo un módulo de compresión entre 1.3667 kPa – 2.7136 kPa sin hinchamiento. Respecto al módulo de tensión se obtuvo para la TC valores entre 577,35 kPa – 679,3 kPa sin hinchamiento y con hinchamiento entre 174,44 kPa – 229,28 kPa. Las pruebas de compresión después del hinchamiento y tensión de la TS no fueron realizadas debido a que no fue posible posicionar las impresiones en el banco de carga debido a su baja resistencia mecánica. Se realizaron las pruebas de colapso, las cuales arrojaron que la TC colapsaba al llegar a la capa 82 a comparación de las impresiones con las TS que colapsaron en la capa 30. Para terminar, se realizó la cuantificación de proteínas presentes en la TS la cual aumentó con el paso de los días, en donde las primeras 48 h se logró una liberación inferior a los 10 mg/ml, pasadas 110 llegó a liberar entre 23,550 mg/ml y 30.747 mg/ml durante las primeras 158 h. En conclusión, la combinación de biomateriales planteados en la TS permitió realizar impresiones con una correcta fidelidad de impresión, sin embargo, el AH, aunque mejoró la fidelidad de impresión respecto a la TC, empeoró las propiedades mecánicas de la TS. La tinta de biomaterial desarrollada podría funcionar como tratamiento para úlceras crónicas de pie diabético debido a que permite imprimir estructuras de hasta 9 mm de altura con una correcta fidelidad de impresión, sin embargo, sería necesario evaluar la capacidad de la TS para la proliferación y migración celular.

Palabras claves: Tinta de biomaterial, Plasma Pobre en Plaquetas, Ácido Hialurónico, Alginato, Bioimpresión.

Abstract

Diabetes has become a public health problem worldwide, the development of pathologies derived from diabetes has increased, such as chronic diabetic foot ulcers. Chronic ulcers are characterized by their difficult healing, taking months and even years to heal. Due to this, therapeutic

alternatives are sought that allow the wound to heal correctly and comply with the specific morphology of each ulcer. With this introduction, the development of 3D bioprinting technology was born, and withit biomaterial inks, through which personalized and functionalized dressings can be printed for each ulcer, providing a therapeutic alternative for chronic diabetic foot ulcers. Based on the above, the project focused on the development of a biomaterial ink that will present a correct printing fidelity using biopolymers such as Alginate (Alg), hyaluronic acid (HA) and Platelet Poor Plasma (PPP), biomaterials used in the field of tissue engineering and 3D printing for its regenerative and mechanical properties. To achieve the objective of this project, tests were carried out to determine the printing parameters that allow correct printing fidelity, as well as mechanical and degradation tests of the evaluated biomaterial ink. The parameters selected for printing the biomaterial ink are 0.25 mm in Load Before Printing, 4°C dispenser temperature, 30% in fill density and 0.7 mm in Retraction Distance, all these parameters of the Dr. Invivo 3D2 Bioprinter. These parameters together with the concentrations of 6.5% w/v of Alginate (Alg) for the control biomaterial ink (TC), of 6.5% w/v of Alg together with 5% w/v of hyaluronic acid (HA) for the selected biomaterial ink (TS) and the crosslinking time in 1 h showed a correct printing fidelity. Following this, the CT and TS were mechanically characterized. A compression Young's modulus between 175.59 kPa - 268.78 kPa was obtained for the CT without swelling in PBS, when the swelling process was carried out in PBS, values between 19.128 kPa - 33.834 kPa were obtained. For the TS a compression modulus was obtained between 1.3667 kPa - 2.7136 kPa without swelling. Regarding the tensile modulus, values between 577.35 kPa - 679.3 kPa without swelling and with swelling between 174.44 kPa - 229.28 kPa were obtained for CT. Compression tests after swelling and tension of the TS were not performed because it was not possible to position the impressions on the load bench due to their low mechanical resistance. The collapse tests were performed, which showed that the TC collapsed when it reached layer 82 compared to those printed with the TS that collapsed at layer 30. Finally, the quantification of proteins present in the TS was performed, which increased

with the passage of days, where the first 48 h a release of less than 10 mg/ml was achieved, after 110 h the 10 mg/ml was exceeded, releasing between 23,550 mg/ml and 30,747 mg/ml during the first 158 h. In conclusion, the combination of biomaterials proposed in the TS allowed prints with a correct print fidelity with the possibility, however, the HA, although it improved the print fidelity with respect to the TC, worsened the mechanical properties of the TS. The developed biomaterial ink could work as a treatment for chronic diabetic foot ulcers because it allows to print structures up to 9 mm in height with a correct printing fidelity, however, it would be necessary to evaluate the capacity of the TS for cell proliferation and migration.

Keywords: Biomaterial Ink, Platelet Poor Plasma, Hyaluronic Acid, Alginate, Bioprinting.

Tabla de Contenido

1.	Problema U Oportunidad	12
	Planteamiento Del Problema	12
	Justificación	13
	Pregunta Problema	14
	Objetivo General	14
	Objetivos Específicos	14
2.	Marco Teórico	15
	Diabetes Mellitus y Úlceras de Pie Diabético	15
	Tratamientos	15
	Hidrogel	16
	Biotinta y su distinción de una tinta de biomaterial.	16
	Alginato (Alg)	17
	Ácido Hialurónico (AH)	18
	Plasma pobre en plaquetas (PPP)	18
	Bioimpresión 3D por extrusión.	19
	Imprimibilidad	20
	Evaluación de imprimibilidad	20
	Prueba de filamento	20
	Prueba de apilamiento de capas	21
	Evaluación de fidelidad de impresión	21
3.	Estado Del Arte	23
4.	Metodología	26
	Preparación de las alícuotas de PPP.	26
	Formulación y preparación de tinta de biomaterial con Ácido Hialurónico	28
	Prueba de extrusión del filamento	28
	Prueba de fusión de filamento.	29
	Obtención de los parámetros de impresión que permitan obtener un filamento imprimible	30
	Evaluación de la fidelidad de impresión pre y post reticulación.	31
	Post-reticulación de la tinta de biomaterial.	33
	Prueba de colapso de estructura	33
	Caracterización mecánica	34
	Pruebas de degradación	35
	Análisis estadístico.	36
5.	Resultados	37
	Prueba de extrusión de filamento para la tinta control.	37
	Prueba de fusión de filamento	41
	Obtención de los parámetros de impresión que permitan obtener un filamento imprimible.	44
	Parámetro Fill Density	50
	Parámetro Retraction Distance.	52

	Parámetro concentración de alginato.	54
	Tinta con ácido hialurónico.	56
	Post-reticulación de la tinta control.	57
	Post-reticulación de la tinta con ácido hialurónico.	59
	Prueba de colapso	61
	Prueba de degradación	67
	Pruebas mecánicas	71
6.	Análisis de resultados	78
	Prueba de extrusión de filamento	78
	Prueba de fusión de filamento	79
	Prueba de extrusión de filamento	79
	Obtención de los parámetros de impresión que permitan tener un filamento imprimible.	80
	Concentración de alginato.	81
	Tinta con Ácido Hialurónico.	81
	Post-reticulación de la Tinta control y Tinta con AH	82
	Prueba de colapso.	82
	Prueba de degradación	83
	Pruebas mecánicas	84
7.	Conclusiones y Recomendaciones	85
8.	Referencias	90
9.	Anexos	100

Lista de Figuras

<i>Figura 1</i>	20
Figura 2	21
Figura 3	27
Figura 4	27
<i>Figura 5</i>	29
Figura 6	29
<i>Figura 7</i>	30
Figura 8	34
Figura 9	35
Figura 10	38
Figura 11	39
Figura 12	40
Figura 13	41
Figura 14	42
Figura 15	43
Figura 16	44
Figura 17	45
Figura 18	46
Figura 19	47
Figura 20	47
Figura 21	48
Figura 22	49

Figura 23.	50
Figura 24.	51
Figura 25.	53
Figura 26.	53
Figura 27.	55
Figura 28.	55
Figura 29.	56
Figura 30.	57
Figura 31.	58
Figura 32.	59
Figura 33.	60
Figura 34.	61
Figura 35.	62
Figura 36.	62
Figura 37.	63
Figura 38.	63
<i>Figura 39.</i>	64
<i>Figura 40.</i>	65
<i>Figura 41.</i>	65
<i>Figura 42.</i>	66
Figura 43.	67
<i>Figura 44.</i>	68
Figura 45.	69

Figura 46.	69
<i>Figura 47.</i>	70
Figura 48.	71
Figura 49.	72
Figura 50.	72
<i>Figura 51.</i>	73
<i>Figura 52.</i>	74
Figura 53.	75
Figura 54.	75
Figura 55.	76
<i>Figura 56.</i>	77

Lista de Tablas

Tabla 1.	26
Tabla 2.	28
Tabla 3.	33

1. Problema U Oportunidad

Planteamiento Del Problema

La diabetes mellitus es un problema de salud pública a nivel mundial, según la OMS, en el año 2019 se convirtió en la novena causa más frecuente de muerte, afectando a más de 422 millones de personas para el año 2014. En Colombia, se estima que 1 de cada 100 colombianos presenta diabetes, según datos del Ministerio de Salud Colombiano. Debido al aumento de pacientes diabéticos, se presenta un incremento en las patologías relacionadas a esta enfermedad, como es el caso de las úlceras de pie diabético, en donde el 25% de los pacientes diabéticos padecen esta afección a lo largo de su vida, de estos, el 6.3% presentan una úlcera activa, donde 4 de cada 5 casos terminan en amputación del miembro inferior (Jiménez S, et al, 2018).

Las úlceras crónicas de pie diabético presentan complicaciones en su proceso de cicatrización, debido al desarrollo de neuropatías y vasculopatías. Las neuropatías provocan daños en las funciones motoras y sensitivas causando que el pie pierda sensibilidad aumentando así las probabilidades de sufrir heridas (Lechleitner M, et al, 2019). Por otro lado, la isquemia genera obstrucciones completas o parciales de arterias en los miembros inferiores causando una baja presencia de oxígeno, lo que impide el cierre eficaz de la úlcera promoviendo la necrosis tisular (Pereira C, et al, 2018).

En particular la cicatrización de úlceras crónicas de pie diabético es un proceso poco efectivo, dada la inflamación crónica y los procesos deficientes en la remodelación de la matriz extracelular, lo que impide el cierre normal de la herida, incrementando el riesgo de infecciones (Solarte D. et al., 2022). Las heridas crónicas de pie diabético se tratan mediante procesos de debridación, apósitos e injertos, sin embargo, estos tratamientos no tienen en cuenta las necesidades de cada herida en partic; en principio, por no proporcionar una matriz extracelular

con biomoléculas que permitan la correcta cicatrización de la herida, y adicionalmente, no consideran las características topográficas de cada úlcera, además, no mantienen una adecuada hidratación de la herida (Bowers, S & Franco, E, 2020).

Justificación

Los hidrogeles son utilizados como apósitos para tratamientos de heridas, por su capacidad de retención de agua, brindando a la lesión tisular un entorno hidratado (Broussard & Powers, 2013). Estos se pueden elaborar mediante distintas técnicas entre ellas la bioimpresión, la cual permite ensamblar biomateriales y células con el fin de crear estructuras tridimensionales funcionales, con el potencial de ser diseñadas considerando las necesidades topográficas de cada úlcera (Leberfinger et al., 2019). Estos hidrogeles son fabricados a partir de biomateriales como colágeno, agarosa o alginato, siendo cada vez más habitual su uso en el desarrollo de tintas de biomaterial debido a que sus propiedades estructurales pueden ser manipuladas al ser mezclados con otros polímeros. También son biocompatibles y se pueden funcionalizar con biomoléculas tales como factores de crecimiento o células. (Jakus et al., 2022).

Entre los biomateriales más utilizados para bioimpresión se encuentra el alginato; el cual brinda soporte mecánico a las células. Sin embargo, es bioinerte, por lo que no desencadena por sí solo procesos de cicatrización en los tejidos lesionados (Rastogi & Kandasubramanian, 2019). Por este motivo, diferentes autores han funcionalizado estos hidrogeles con biomoléculas que induzcan la reparación del tejido. Entre las biomoléculas se destaca el uso de factores derivados de plasma pobre en plaquetas, los cuales estimulan la angiogénesis, la migración y la proliferación celular (Devereaux, Nurgali, Kiatos, Sakkal & Apostolopoulos, 2018). Otros componentes de matriz extracelular también han sido utilizados para mejorar las características

funcionales de los apósitos, tales como el ácido hialurónico, el cual cuenta con propiedades antiinflamatorias y de adhesión celular, lo que mejora los procesos de reparación de tejido (Graça et al., 2020). Considerando la necesidad de diseñar nuevas tintas de biomateriales que permitan imprimir hidrogeles funcionales acorde a la topografía de la herida, se ha planteado este proyecto, que busca el diseño de una tinta de biomaterial a base de alginato, funcionalizada con ácido hialurónico y factores de crecimiento derivados de plasma pobre en plaquetas.

Pregunta Problema

¿Cuál es la fidelidad de impresión de una tinta de biomaterial a base de alginato, ácido hialurónico y plasma pobre en plaquetas?

Objetivo General

Desarrollar una tinta de biomaterial para bioimpresión 3D a base de alginato, ácido hialurónico y plasma pobre en plaquetas, para su posible uso en alternativas terapéuticas dirigidas a úlceras crónicas de pie diabético.

Objetivos Específicos

1. Establecer las concentraciones de alginato pre-reticulado, ácido hialurónico y plasma pobre en plaquetas para la obtención de un filamento imprimible.
2. Evaluar la fidelidad de impresión de la tinta de biomaterial bajo condiciones de pre y post reticulación al variar las condiciones de impresión.
3. Determinar las propiedades mecánicas de las estructuras 3D impresas con la tinta de biomaterial.

2. Marco Teórico

Diabetes Mellitus y Úlceras de Pie Diabético

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica producida por fallas en la regulación o control de la glucosa en sangre, ya sea por la falta de producción de insulina, resistencia a la insulina o ambas. La diabetes tipo 1 se caracteriza por la destrucción o ausencia de células beta y de manera consecuente niveles de insulina bajos o inexistentes; por otra parte, tenemos la diabetes mellitus tipo 2 la cual se produce por una resistencia a la insulina (Sapra & Bhandari, 2022). Las úlceras de pie diabético son una complicación derivada de la diabetes mellitus, estas úlceras o heridas presentes en el pie del paciente son multifactoriales, esto quiere decir que incluyen complicaciones de neuropatía diabética, vasculopatía, inmunopatía o control glucémico deficiente. La neuropatía diabética produce disfunción sensorial, motora y nerviosa además de ser la causa más común de úlceras diabéticas en las extremidades inferiores. La neuropatía diabética en conjunto con las demás afecciones causa que la piel del paciente se torne seca y frágil, aumentando la posibilidad de la formación de fisuras o pérdida de la cito arquitectura de la piel, desarrollándose así las úlceras. (Del Core et al., 2018)

Tratamientos

Entre los tratamientos más usados para mejorar el ambiente físico o biológico de la úlcera de pie diabético, encontramos: tratamiento por descarga, desbridamiento o apósitos. El tratamiento por descarga se realiza mediante el uso de calzado ortopédico, aparatos ortopédicos, ortesis o andadores, con el fin de realizar una redistribución de la carga del peso corporal sobre el pie afectado para reducir la presión sobre este. El desbridamiento consiste en retirar el tejido

necrótico presente en la úlcera promoviendo la cicatrización de la herida. Finalmente, los apósitos son una cobertura o vendaje que permite proteger la úlcera y promover el proceso de cicatrización funcionando como aislante bacteriano, térmico e incluso proveyendo de medicamentos como la fitoestimulina (que permite una mejor reepitelización), medicamentos que alivien el dolor, o limiten las infecciones en la úlcera. (Wu, Norman, Dumville, O'Meara & Bell-Syer, 2015), (Pérez-Panero, Ruiz-Muñoz, Cuesta-Vargas & González-Sánchez, 2019)

Hidrogel

Un hidrogel es una red tridimensional de base polimérica, formada mediante enlaces temporales y caracterizada por su gran capacidad de absorción de fluidos. Esta característica lo postula como un gran candidato para tratamiento de liberación controlada de fármacos, entre otros usos como: apósitos, geles de electroforesis, medio para cultivo celular, biomaterial, entre otros. (Escobar, García, Zaldivar & Amashta, 2003). Los hidrogeles permiten modificar sus propiedades mecánicas por medio de la variación de su grado de reticulación, porosidad y viscosidad. Estas capacidades les permiten a los hidrogeles ser versátiles al momento de ser usados como material para bioimpresión 3D (Rastogi & Kandasubramanian, 2019).

Biotinta y su distinción de una tinta de biomaterial.

Una biotinta es un fluido compuesto por material biológico como células vivas, factores de crecimiento y polímeros naturales o sintéticos que sirven de andamio, con la característica de que al ser extruido en una impresora 3D permite consolidar estructuras complejas que buscan asimilarse a los componentes anatómicos. Estas estructuras son diseñadas con el fin de promover la regeneración o reparación tisular, y de cierto modo, tras su maduración la funcionalidad en los

tejidos. Las biotintas pueden ser clasificadas en biotintas con andamios o sin andamios según la estructura que presenten. Las biotintas basadas en andamios usan células que dan soporte estructural para apoyar el crecimiento, proliferación y diferenciación celular, además de brindar una resistencia mecánica que funciona como molde o base para la formación de un tejido; por otro lado, las biotintas sin andamio tiene como fin adherirse a un tejido ya existente para ayudar en la proliferación a nivel celular, más no como un soporte estructural (Benwood et al., 2021). Como fue descrito anteriormente el eje principal de una biotinta es el componente celular, por tanto, al tener una composición ausente de células se define como una tinta de biomaterial (Galeano Blanco, 2021).

Alginato (Alg)

El alginato es un polisacárido de origen natural proveniente de algas verdes pardas o bacterias. Son usados en diversas áreas como: ingeniería de tejidos, apósitos para heridas e incluso la producción de fármacos. Se compone en gran proporción de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico. Estos dos componentes se unen mediante un enlace 1,4-glucosídico formando bloques que se organizan en unidades; bien sea unidades M (las cuales se componen de dos bloques de ácido manurónico), o unidades G (compuestas por dos unidades G de ácido gulurónico) e incluso en algunos casos se encuentran combinaciones mixtas entre bloques como GM o MG. Al ser un material biocompatible se ha usado para la cicatrización de heridas en distintas presentaciones como fibras, tópicos, películas, microesferas e hidrogeles. (Zhang, Cheng & Ao, 2021)

Ácido Hialurónico (AH)

El ácido hialurónico es un polisacárido compuesto por unidades repetitivas de disacáridos D-glucurónico y Nacetil-D-glucosamina unidas mediante enlaces de hidrógeno. Estas unidades repetitivas se caracterizan por ser largas y no ramificadas. Suele encontrarse principalmente en partes del cuerpo humano como el líquido sinovial, tejidos embrionarios y matriz extracelular de tejidos blandos. Entre sus funciones se encuentra el efecto humectante en la matriz extracelular, la regulación de la homeostasis celular, resistencia a la compresión y es el responsable del aspecto gelificado de la matriz extracelular. También juega un papel importante en la piel promoviendo procesos inflamatorios, proliferativos e incluso participa en la diferenciación celular durante el proceso de cicatrización de heridas. (Abatangelo, Vindigni, Avruscio, Pandis & Brun, 2020), (Zhai et al., 2020)

Plasma pobre en plaquetas (PPP)

El PPP es un producto proveniente del plasma, más específicamente un subproducto del plasma rico en plaquetas, el cual tiene niveles de plaquetas por debajo de los niveles basales en la sangre. El PPP induce a la diferenciación de células a la vía mitogénica y la formación de miotubos; factores que ayudan a la regeneración musculoesquelética, a pesar de tener niveles más bajos de factores de crecimiento que el plasma rico en plaquetas (PRP). Posee resguardos de factores de crecimiento como PDGF, el cual promueve el crecimiento y división celular, así como también el factor IGF-1 que estimula el crecimiento de huesos y tejidos. (Chellini, Tani, Zecchi-Orlandini & Sassoli, 2019). En análisis proteómicos realizados en busca de diferencias entre el PRP y PPP se detectaron quince proteínas pertenecientes únicamente al PPP; entre estas resalta la neogenina, la cual es una proteína similar al factor de crecimiento de los hepatocitos,

fibronectina y glicoproteínas funcionales de la matriz extracelular; el hallazgo de estas proteínas indica que el PPP contribuye a la formación de fibrillas, curación y cicatrización de heridas.

(Miroshnychenko, Chalkley, Leib, Everts & Dragoo, 2020)

Bioimpresión 3D por extrusión.

La bioimpresión es una técnica que permite la impresión 3D de formas, geometrías o estructuras libres a partir de distintos biomateriales, células o moléculas junto con un diseño personalizado en el cual se deposita capa a capa los componentes para la construcción de estructuras complejas a partir de una solución en forma de hidrogel conocida como tinta de biomaterial. Esta tinta de biomaterial debe cumplir con propiedades mecánicas, químicas y biológicas que conduzcan a una adecuada resistencia mecánica, biocompatibilidad, gelificación y biodegradabilidad (Gao, Kim & Gao, 2021). La bioimpresión por extrusión utiliza un sistema de extrusión el cual ejerce una presión a la tinta de biomaterial de manera constantemente a través de una boquilla mediante un sistema neumático de presión o tornillo, usando la compresión como fuerza impulsora y siguiendo una ruta trazada en los ejes x, y, z mediante un diseño computacional. Dependiendo de la viscosidad de la tinta de biomaterial y la presión ejercida sobre la misma, se define la viabilidad celular de la impresión (Gungor-Ozkerim, Inci, Zhang, Khademhosseini & Dokmeci, 2018). Esta técnica de bioimpresión ofrece distintos tipos de cabezales que permiten imprimir varios materiales o tintas de biomaterial en una misma estructura, con el fin de funcionalizar la impresión según sus componentes, tipos de células y densidades (Gillispie et al., 2020).

Imprimibilidad

La imprimibilidad se define como la capacidad que tiene una tinta de biomaterial o biotinta para ser usada en impresión 3D. Para lograrlo requiere definir variables como la viscosidad del material, métodos de gelificación, propiedades reológicas, el calibre de la boquilla, entre otras; todo esto con el fin de que luego sea evaluada mediante distintos métodos de fidelidad de forma (Ouyang, Yao, Zhao, and Sun, 2016).

Evaluación de imprimibilidad

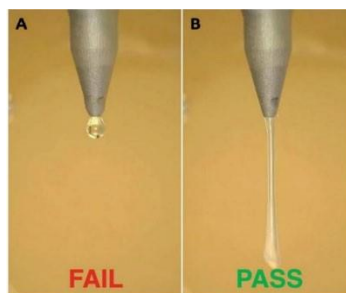
Para llevar a cabo una correcta evaluación de imprimibilidad de una tinta de biomaterial por el método de extrusión, se requiere desarrollar dos pruebas fundamentales:

Prueba de filamento

Se carga la tinta de biomaterial en el cartucho de impresión. Posteriormente se procede a ejercer presión sobre la boquilla y se realiza una impresión de prueba aumentando poco a poco la carga de impresión. Esto con el fin de observar la morfología de salida del filamento impreso ante la salida de la tinta de biomaterial. Existen dos posibles escenarios: un escenario fallido, en el cual salen gotas de la boquilla y no se forma el filamento, y un escenario exitoso donde se forma un filamento de más de cinco milímetros, ver figura 1. (O'Connell et al., 2022).

Figura 1.

Filamento en extrusión.



Nota. La figura A hace alusión a una tinta de biomaterial no apta para imprimir, B.

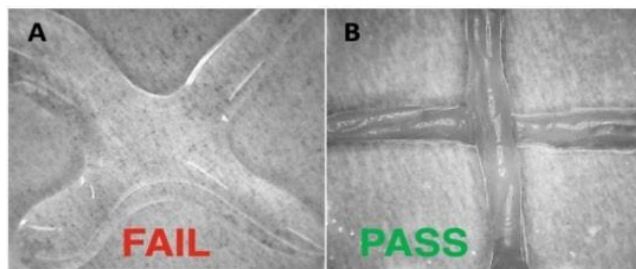
Ejemplo de una tinta de biomaterial apta para imprimir, ensayo de caída de filamento Tomado de (O'Connell et al., 2022).

Prueba de apilamiento de capas

Se carga el cartucho de impresión con la tinta de biomaterial y luego se comienza a imprimir, extruyendo sobre una placa de Petri dos trazos de forma perpendicular formando una cruz. Para que la tinta de biomaterial pase la prueba no se deben fusionar los filamentos extruidos, por el contrario, se deben apilar uno encima de la otro como filamentos independientes, ver figura 2.

Figura 2.

Fusión de Filamentos impresos.



Nota. La imagen A muestra Filamentos de tinta de biomaterial fusionados, en contraparte la imagen B ejemplifica filamentos de tinta de biomaterial superpuestos. Tomado de (O'Connell et al., 2022).

Evaluación de fidelidad de impresión

La evaluación de fidelidad de impresión (FI) se realiza de manera cuantitativa y cualitativa. La prueba cualitativa consta de una inspección visual en la que se compara el diseño

computacional y la impresión, enfocándose en aspectos como la porosidad, la forma, tamaño e incluso el aspecto del poro y los filamentos, Wu et al. (2018). La prueba cuantitativa se lleva a cabo calculando el porcentaje de error mediante la evaluación del área experimental (Ae) en comparación al área teórica (At), ver Ecuación 1. Cabe aclarar que estas fórmulas se aplican para la impresión de rejillas ya que, a partir de la medición del área de los cuadrados internos de estas (por medio del software ImageJ) es que se obtiene los valores necesarios efectuar la fórmula, (Habib, Sathish, Mallik, & Khoda, 2018).

%Error Impresión

$$\frac{At - Ae}{At} * 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

También encontramos fórmulas de evaluación de fidelidad de impresión como la tasa de difusión (TD), ver ecuación 2, que consiste en la división del área experimental (Ae) sobre la teórica (At).

$$\text{Tasa de difusión (TD)} = \frac{Ae}{At} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Mediante las medidas obtenidas de las rejillas se toman como punto de partida su perímetro y área, para calcular la imprimibilidad en función de la fidelidad formada mediante la ecuación 3; donde L es el perímetro y A es el área, Ouyang et al. (2016).

$$\text{Imprimibilidad} = \frac{L^2}{16A} \quad \text{Ecuación (3)}$$

3. Estado Del Arte

Las úlceras de pie diabético han llamado la atención con el paso de los años debido a la dificultad de encontrar un tratamiento efectivo para su cicatrización. La necesidad de una correcta cicatrización de las úlceras crónicas de pie diabético y el avance tecnológico en la curación de heridas promovió el desarrollo de tratamientos, tales como; injertos de piel, cremas tópicas, terapia hiperbárica de oxígeno y geles. Sin embargo, sólo este último tratamiento mostró una mejora en el proceso de cicatrización de la úlcera (O'Meara et al., 2001). El prometedor hallazgo de inducir la cicatrización de las úlceras de pie diabético incrementó el desarrollo de los geles e hidrogeles, ya que tenían propiedades como retención de agua y alivio del dolor; que permitían usarlos como apósitos en el tratamiento de heridas (O'Meara et al., 2001). La efectividad del proceso de cicatrización del tejido usando hidrogeles recae en los materiales de fabricación. Los hidrogeles son fabricados usando polímeros, los cuales pueden ser sintéticos o naturales (Hussain et al., 2018). Los polímeros sintéticos (PS) como el Polietilenglicol diacrilado (PEGDA) o la Polycaprolactona (PCL), promueven la curación de heridas, sin embargo, se ha demostrado la necesidad de encapsular biomoléculas que induzcan estos procesos (Chang et al., 2022), como es el caso de la matriz de PEGDA y PCL funcionalizada con diversos factores de crecimiento como; Factor básico para crecimiento de Fibroblastos y Factor de crecimiento epidérmico, que lograron promover el cierre de úlceras de pie diabético (Choi et al., 2011). En el caso de los polímeros naturales (PN), gozan de ser altamente bioactivos debido a que la mayoría son precursores naturales de las matrices extracelulares de diferentes tejidos, sin embargo, presentan propiedades mecánicas deficientes (Hussain et al., 2018). Existe una amplia variedad de PN utilizados para la formación de hidrogeles, como el Alginato (Alg) o el Ácido Hialurónico (AH), entre otros. El alginato es utilizado debido a que brinda propiedades mecánicas a otros PN,

como es el caso del hidrogel de Alginato y Quitosano, el cual presentó una buena biocompatibilidad y promovió la curación de una herida por quemadura de segundo grado en una rata (Zhang et al., 2021).

El AH es un componente abundante de las matrices extracelulares de diferentes tejidos como la piel y se ha utilizado para el tratamiento de heridas gracias a sus capacidades angiogénicas, hidratantes, antiinflamatorias e inmunosupresoras cuando se encuentra con un bajo peso molecular ($< 1\text{Mda}$) (Graça et al., 2020). Como ejemplos de su uso, tenemos la formulación de un hidrogel de Alg y AH con factores de crecimiento, como el Factor de crecimiento de Hepatocitos, que permitió la recuperación de la lesión en las cuerdas vocales de un conejo (Choi et al., 2020), así como la fabricación de hidrogeles de AH-colágeno sensibles al pH para el tratamiento de úlceras diabéticas en ratón, en donde se promovió la adhesión e infiltración de fibroblastos e inhibió la proliferación de macrófagos en la herida (Jia et al., 2022); también se encuentran hidrogeles de AH que encapsulan un líquido iónico para tratar heridas diabéticas, el cual demostró tener propiedades mecánicas deseadas, así como flexibilidad y conductividad eléctrica (Liu et al., 2022). Por otro lado, se encuentran matrices de plasma que presentan una alta bioactividad gracias a los factores de crecimientos derivados de plaquetas que promueven la angiogénesis mediante la inducción de migración, diferenciación y supervivencia de las células endoteliales. Sin embargo, los hidrogeles de plasma poseen propiedades mecánicas muy limitadas, por lo que generalmente se combinan con otros PN como es el caso del Alg, en donde se ha usado para encapsular el plasma (Growney et al., 2019). Respecto a su potencial de cicatrizar heridas, ha promovido la proliferación y migración de células epiteliales de la córnea in vitro, (Mallis et al., 2022), además, se ha evidenciado en hidrogeles de PPP la capacidad de mantener la estabilidad fenotípica y la viabilidad de células madre embrionarias humanas (Lewis et al., 2012).

Los hidrogeles presentan la capacidad de modificar sus propiedades mecánicas, brindando la posibilidad de que adopten distintas formas al ser extruidos como filamento o puestos en moldes, permitiendo incursionar en tecnologías como la bioimpresión 3D (Gungor-Ozkerim et al., 2018). Mediante esta técnica se tiene la posibilidad de imprimir un apósito personalizado para la úlcera de pie diabético del paciente, lo cual beneficia su proceso de cicatrización (Koehler, Brandl & Goepferich, 2018). Actualmente se han desarrollado diferentes tintas de biomaterial y biotintas para impresión 3D, como es el caso de las compuestas de Alg y AH, en las cuales se desarrollaron una biotinta a diferentes ratios de concentración v/v (100% Alg 0% AH, 90% Alg 10% AH y 70% Alg 30% AH) de las cuales pudieron concluir que al aumentar la concentración de AH aumentaba la viabilidad celular, pero las estructuras impresas presentaban un mayor error en su impresión (Lee et al., 2021). De igual se han planteado una biotintas para la reparación de cartílago en donde utilizaron dos concentraciones de Alg y AH (1% w/v, 2% w/v). El estudio evidenció que al mezclar ambos PN se aumentaba la viscosidad de la biotinta lo que ayudó a proteger las células de las fuerzas mecánicas al momento de la extrusión, aumentando así la viabilidad celular, la cual se mantuvo sobre el 85% incluso después de reticular la biotinta (Antich et al., 2020). Otras combinaciones de PN se han implementado como es el caso de las biotintas de Alg y PPP, al implementar una biotinta que brindó un entorno adecuado para la supervivencia de fibroblastos y liberó VEGF durante los 18 días de estudio (Del Amo et al., 2021). Dentro de las formulaciones para biotintas presentes en la bibliografía, no se ha implementado la combinación del Alg, AH y el PPP, la cual promete ser una buena alternativa debido a las capacidades individuales de los tres componentes anteriormente mencionados, por lo que se plantea su desarrollo en el presente trabajo de grado.

4. Metodología

Preparación de las alícuotas de PPP.

Para la preparación de alícuotas de PPP se tomaron tres tubos Falcón de 50 ml, que contenían aproximadamente 25 ml de PPP provenientes de diferentes pacientes, el cual fue producto de la obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) (El PPP fue donado por el Banco Multitejidos y Centro de Terapias Avanzadas de la Clínica Foscal Internacional). Estos tubos fueron centrifugados a 700 g por 10 min con el fin de eliminar cualquier partícula o precipitado presente en el plasma. Se realizó un pool del PPP para disminuir la variabilidad de resultados entre donantes; este pool fue alicuotado en tubos de falcón de 15 ml y almacenado a -80°C hasta el momento de su uso.

Formulación y preparación de la tinta control.

La tinta control (TC) se basó en una tinta de biomaterial a base de alginato (5.5% p/v) y PPP (solvente) anteriormente planteada en la tesis de Rosero Nicolas y Gómez Jair (2021). Adicional a esta tinta se prepararon también las concentraciones de 6.5% y 7.5% p/v, y se pre-reticularon mediante CaCl_2 en relación 1:10, Alg: CaCl_2 , ver tabla 1. La solución con el agente reticulante, se mezcló con un agitador vertical a 155 rpm a 4°C durante 30 minutos, usando un aspa previamente diseñada, ver figura 3.

Tabla 1.

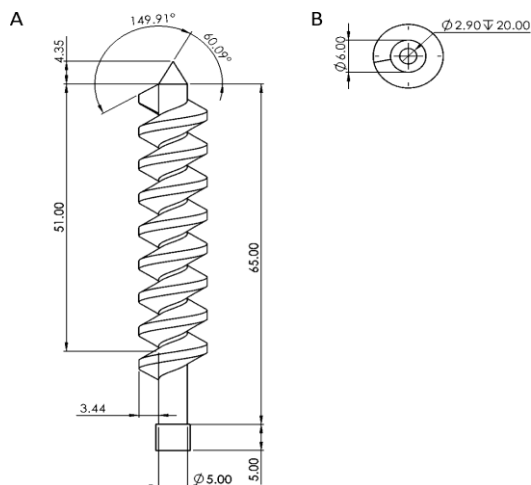
Concentraciones utilizadas en la formulación de la TC utilizando 5 ml de PPP.

Tabla 1. TC				
[Alginato]	Alginato (mg)	CaCl_2	CaCl_2 (mg)	PPP (ml)
5.5%	275		27.5	
6.5%	325	1:10	32.5	5*
7.5%	375		37.5	

* El volumen final de PPP fue aforado a 5 ml

Figura 3.

Diseño CAD del Aspa del agitador vertical.



Nota. La figura A representa la vista frontal del modelo CAD, La figura B la vista inferior. El diseño fue realizado utilizando el Software SolidWorks 2022. Las unidades están en milímetros.

Por último, se tomó una jeringa de 5 ml sin émbolo y se le añadió parafina para cubrir la boquilla. Se traspasó la tinta de biomaterial a esta jeringa con la ayuda de una espátula. Se tapó con parafina la abertura para el émbolo de la jeringa, ver figura 4, y se introdujo la jeringa en un tubo falcón de 50 ml, posteriormente se centrifugó a 3000 g durante 30 minutos a 4°C.

Figura 4.

Ejemplo de Jeringa post centrifugación.



Formulación y preparación de tinta de biomaterial con Ácido Hialurónico

Posterior a la selección de la concentración de alginato para la tinta control, se procedió a preparar la tinta de biomaterial con concentraciones de ácido hialurónico al 1%, 2% y 5% en 5 ml en PPP, ver la Tabla 2.

Tabla 2.

Concentraciones de AH utilizadas en la formulación de la tinta de biomaterial.

Tintas de PPP, Alginato y AH				
[Alginato]	Alginato (mg)	[Ácido Hialurónico]	Ácido Hialurónico (mg)	PPP (ml)
6.5%	325	1%	50	5*
		3%	150	
		5%	250	

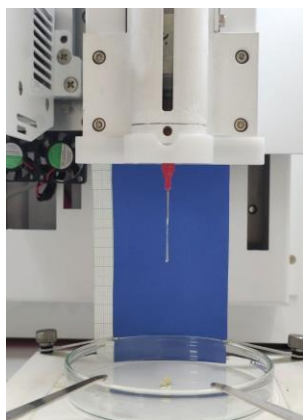
* El volumen final de PPP fue aforado a 5 ml.

Prueba de extrusión del filamento

Las tintas de biomaterial preparadas en sus respectivas jeringas se colocaron una a una en el módulo de extrusión de la bioimpresora y se realizaron desplazamientos al émbolo de 0.1 mm o 0.2 mm con intermedios de tres minutos hasta que la tinta fluyera. Luego se esperó a que el flujo se estabilizará en el transcurso de 10 minutos y se realizó el registro fotográfico de cada tinta como se muestra en la Figura 5.

Figura 5.

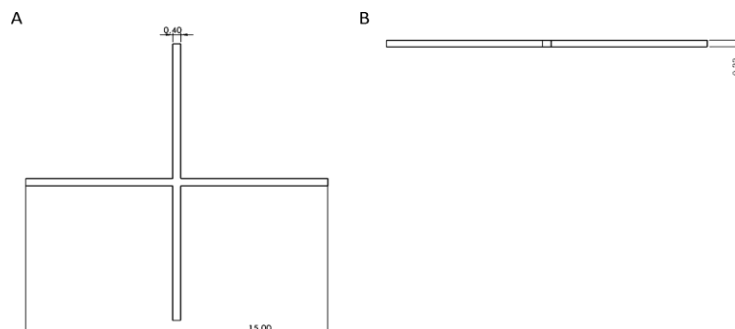
Fotografía representativa de la extrusión del filamento.

**Prueba de fusión de filamento.**

La prueba de fusión de filamento consistió en una jeringa de 5 ml con la tinta de biomaterial a evaluar para luego imprimir sobre una placa de Petri dos trazos de forma perpendicular formando una cruz como se muestra en la Figura 6. Tras 5 minutos posteriores a la impresión se realizó el registro fotográfico mediante un microscopio con aumento 4x, donde se determinó si existía fusión de filamentos.

Figura 6.

Diseño CAD "cruz" para las pruebas de entrecruzamiento.



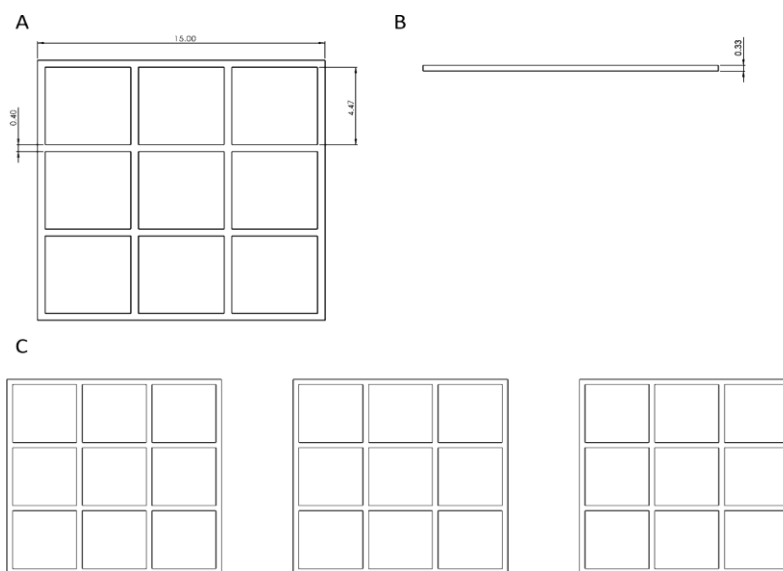
Nota. La figura A hace referencia la vista superior del CAD, la figura B a la vista lateral derecha del CAD.

Obtención de los parámetros de impresión que permitan obtener un filamento imprimible

Inicialmente se tomaron como base los parámetros encontrados en la tesis de Eraso, N., & Gómez, J. (2021) los cuales fueron: load before print (0.8 mm), fill density (45%), retraction distance (0.5 mm) y temperatura del cabezal de impresión a 20°C. De igual forma se evaluó la tinta de 5.5% planteada en la misma tesis y adicional a esta tinta, las tintas de 6.5% y 7.5% de Alg. La evaluación de la fidelidad de impresión se realizó mediante la impresión de tres rejillas, cada una con nueve poros como se muestra en la Figura 7. De las tres rejillas, la primera en ser impresa se descartó del análisis debido a que se usó junto con la falda de impresión para estabilizar el flujo de impresión de la tinta de biomaterial, dando un mayor lapso a la bioimpresora para la aplicación de los parámetros usados. Las dos rejillas restantes se utilizaron para realizar la cuantificación del porcentaje de error de área, la tasa de difusión e imprimibilidad utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3 respectivamente.

Figura 7.

Modelo CAD "Rejilla" de impresión.



Nota. La figura A hace referencia a la vista superior del CAD, la B a la vista lateral. La figura C ejemplifica el modelo de las tres rejillas impresas usado para la cuantificación de la fidelidad de forma con medidas en mm.

Con el fin de establecer si la fidelidad de impresión podría mejorarse, se modificaron los parámetros de impresión. El primer parámetro modificado fue Load Before Print junto con la temperatura del cabezal de impresión, en donde se tomaron valores inferiores al valor base (0.8 mm). Se utilizaron valores de 0.5 mm, 0.35 mm y 0.25 mm; con el extrusor de la bioimpresora a una temperatura de 20°C y 4°C. La temperatura de 4°C se evaluó con la intención de mantener la cadena de frío del PPP el mayor tiempo posible para reducir la posibilidad de la degradación de los factores de crecimiento del PPP y el riesgo de contaminación por microorganismos. Posteriormente, se procedió a variar el parámetro Fill Density en donde se escogieron porcentajes mayores (60%) y menores (30% y 15%) al establecido como parámetro base (45%). Para finalizar se modificó el parámetro Retraction Distance, que se tenía asignado de base (0.5 mm). Se utilizaron valores inferiores: 0.3 mm y superiores: 0.7 mm y 1 mm. Luego de cada impresión se tomaron registros fotográficos en todos los parámetros y adicionalmente se procesaron las imágenes con el software ImageJ para hallar el área y perímetro de los cuadrados internos de la rejilla. Con esto se llevó a cabo la cuantificación de la fidelidad de impresión y la búsqueda del parámetro que presentara un porcentaje de error de impresión más bajo, así como una tasa de difusión e imprimibilidad cercanas a uno.

Evaluación de la fidelidad de impresión pre y post reticulación.

Para la obtención del error de impresión, la tasa de difusión y la imprimibilidad se utilizó el software ImageJ. Se procesaron los registros fotográficos pasando las imágenes a escala de grises, para posteriormente aplicarle un filtro pasa banda, ver figura 8, y cambio de contraste

como se muestra en la Figura 9. Todo esto con el fin de observar de manera más clara los poros de la rejilla (cuadrados internos de la rejilla); y así determinar su área y perímetro. Una vez obtenidos los resultados, se procede a utilizar las ecuaciones 1, 2 y 3 para seleccionar los mejores parámetros de impresión y tinta de biomaterial.

Figura 8.

Parámetros del filtro pasa banda.

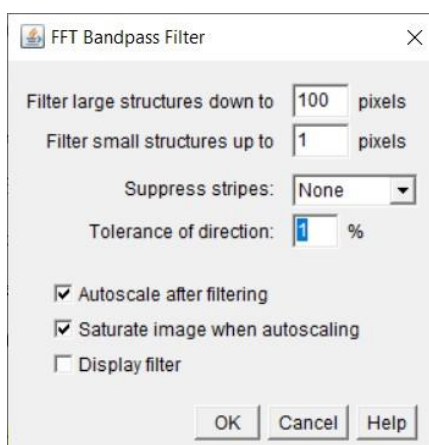
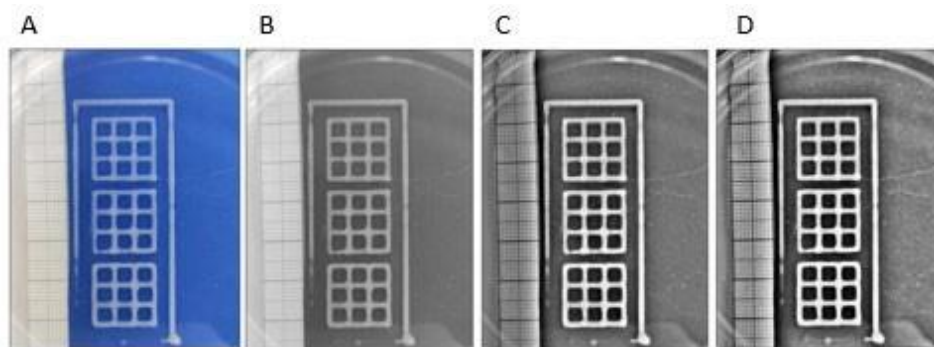


Figura 9.

Procesamiento de imágenes en ImageJ.



Nota. A) Imagen original. B) Imagen en escala de grises. C) Imagen con filtro pasa banda. D) Imagen con cambio de contraste en 80%, normalizada y con igualación del histograma.

Post-reticulación de la tinta de biomaterial.

El proceso de post reticulación de la tinta seleccionada consistió en agregar a cada impresión 5 ml de una solución a 550 mM de CaCl₂, procurando que quedaran totalmente sumergidas durante 10 min, 20 min, 30 min ,60 min, 120 min, 180 min y 240 minutos, ver Tabla 3. Concluido este tiempo se generó un registro fotográfico de cada impresión para determinar el tiempo en el cual el error de área permanece constante.

Tabla 3.

Parámetros establecidos para la prueba de post- reticulación de las tintas de biomaterial.

CaCl₂ (mM)	Tiempo de reticulación (min)						
550	10	20	30	60	120	180	240

Prueba de colapso de estructura

La prueba de colapso consistió en realizar una impresión con un grosor de 0.3 mm por capa hasta que la estructura colapsara, con la intención de registrar el número de capas y la altura de la impresión en este punto. Luego, se realizó una impresión con una capa menos de la determinada en el registro anterior, es decir, una capa anterior al colapso de la estructura, para realizar la comparación de la altura obtenida con la altura teórica del diseño CAD. Para las pruebas de colapso el parámetro de diámetro de filamento pasó de 13 mm a 8 mm con la intención de aumentar el flujo de extrusión, adicionalmente también se removió la boquilla de

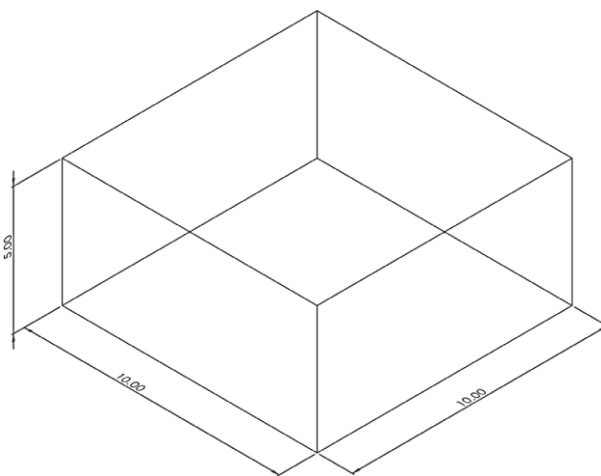
teflón de la jeringa de impresión con el fin de aumentar el diámetro de salida de la tinta a 0.4 mm, debido a que se presentaron problemas de obstrucción de flujo con esta boquilla.

Caracterización mecánica

Se realizaron treinta y dos impresiones, dieciséis para la prueba de compresión y dieciséis para la prueba de tensión, siguiendo los modelos CAD de la figura 8 y 9 respectivamente. En cada prueba se realizaron cuatro impresiones que se dejaron en hinchamiento con PBS durante un día, y otras cuatro que no estuvieron en hinchamiento como control de la prueba. Todas las impresiones fueron reticuladas con la solución de 550 mM de CaCl_2 y el tiempo escogido en las pruebas de reticulación, para posteriormente evaluarlas en el banco de carga con la intención de determinar su módulo de elasticidad por medio de la ecuación obtenida al realizar la gráfica de deformación vs esfuerzo. Las pruebas de tensión y compresión se realizan en el banco de carga ElectroForce 3200 Serie III, usando una celda de carga de 45N a una velocidad de 0.05 mm/s para la prueba de compresión y de 0.3 mm/s para las pruebas de tensión.

Figura 8.

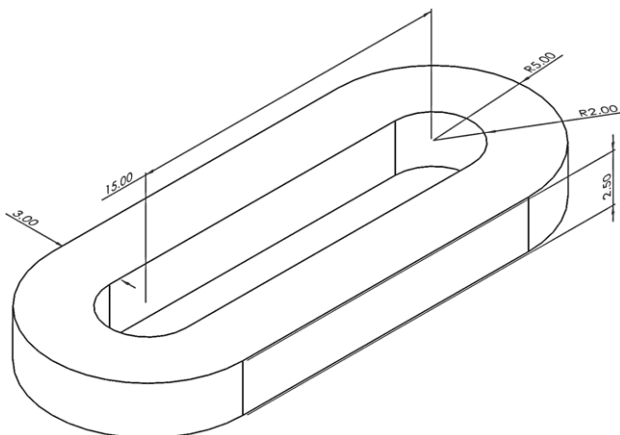
Diseño CAD para las pruebas mecánicas de compresión en las tintas de biomaterial.



Nota. Las medidas están en milímetros.

Figura 9.

Anillo diseñado para las pruebas mecánicas de tensión en las tintas de biomaterial.



Nota. Las medidas están en milímetros.

Pruebas de degradación

Se prepararon nuevas alícuotas para estas pruebas usando la cabina de flujo laminar y utensilios estériles. Se descongelaron cuatro muestras de PPP de distintos pacientes para hacer un pool y alicuotar 5 ml de PPP en tubos falcón estériles de 15ml, para después depositar la cantidad de PPP destinada para la preparación de la tinta de biomaterial en un tubo de falcón estéril de 45 ml. Se preparó la tinta de biomaterial que presentó las mejores características (5% de AH y 6.5% de Alginato) para llevar a cabo las impresiones. Luego se agregaron 6 mL de PBS a cada placa y se incubaron a temperatura ambiente (20°C). Se realizó la cuantificación de proteínas a las 5 horas, 20 horas, 32 horas, 44 horas y 68 horas con el espectrofotómetro NanoDrop One, teniendo en cuenta el blanco (PBS), una absorbancia de 280 nm y usando para la curva estándar: Albúmina de suero bovino, la cual esta calibrada en el nanodrop. También se analizó cualitativamente, por medio de registros fotográficos, la evolución de la degradación de las

impresiones mediante el cambio en la coloración del PBS y la cantidad de fragmentos suspendidos en él.

Análisis estadístico.

Los resultados que se obtuvieron de las pruebas de fidelidad de forma fueron expresados como la media aritmética de los valores \pm error estándar (ESM). Se generaron las comparaciones entre los grupos de estudio utilizando análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de pruebas post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples, previa comprobación de los supuestos del modelo tales como independencia, normalidad y homocedasticidad. Cuando las poblaciones evaluadas demostraron ser no normales, se realizó el análisis ANOVA de una vía no paramétricos. De igual forma en la comparación de las temperaturas del dispensador, se realizaron análisis t-student. Para todos los análisis estadísticos realizados, los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos, lo que en las gráficas se representa por un asterisco (*), de igual forma los valores de $p < 0.01$, $p < 0.001$ y $p < 0.0001$ son representados con dos (**), tres (***) y cuatro asteriscos (****) respectivamente. Se llevaron a cabo tres réplicas por experimento ($n = 3$) y dos experimentos.

5. Resultados

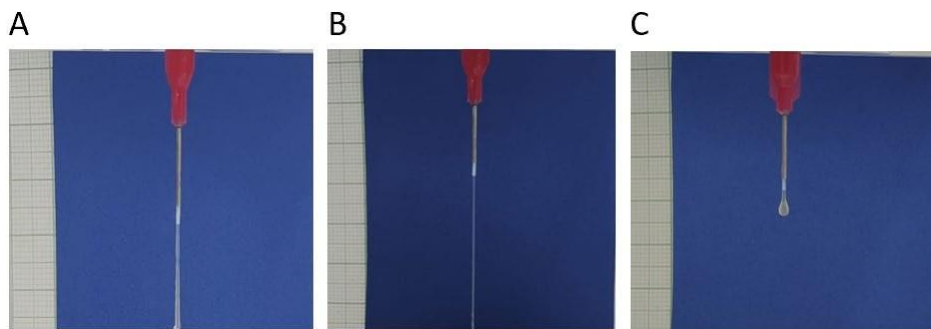
Prueba de extrusión de filamento para la tinta control.

Para seleccionar la concentración de alginato que se usaría para determinar los parámetros de impresión se realizó inicialmente la prueba de extrusión de filamento con las tintas de biomaterial a base de Alg (5.5%, 6.5% y 7.5% p/v) y PPP (Solvente). Se posicionó la jeringa en el módulo de impresión y se aplicaron de 3 a 5 veces loads para estabilizar el flujo del filamento en la bioimpresora. Posteriormente se llevó a cabo el registro fotográfico con la intención de que en forma cuantitativa (con ayuda de una hoja milimétrica y el software ImageJ) y cualitativa, se puedan determinar las características del filamento. Conociendo su estado de gelación, se encontró que las tres tintas de biomaterial presentaron diferentes estados mostrados en la Figura 10.

La tinta de biomaterial con 5.5% de alginato, presentó un estado sub-gelado, debido a la formación de gotas de la tinta al momento de su extrusión, esto llevó a que en ningún momento se obtuviera un filamento como se observa en la Figura 10. Caso contrario sucede con los filamentos de las tintas de biomaterial al 6.5% p/v y 7.5% p/v de Alg, en donde se evidencia la formación de un filamento, ver Figura 10 inciso B y A respectivamente. Sin embargo, para la tinta de biomaterial al 7.5% Alg se muestra la formación de segmentos de diferente grosor en el filamento indicando que se presenta un estado sobre gelado. Respecto a la tinta de 6.5% Alg, se evidenció un filamento constante y sin segmentos o grumos, indicando un estado de gelación adecuado.

Figura 10.

Imágenes representativas de extrusión de filamento de las diferentes concentraciones de Alginato usadas.

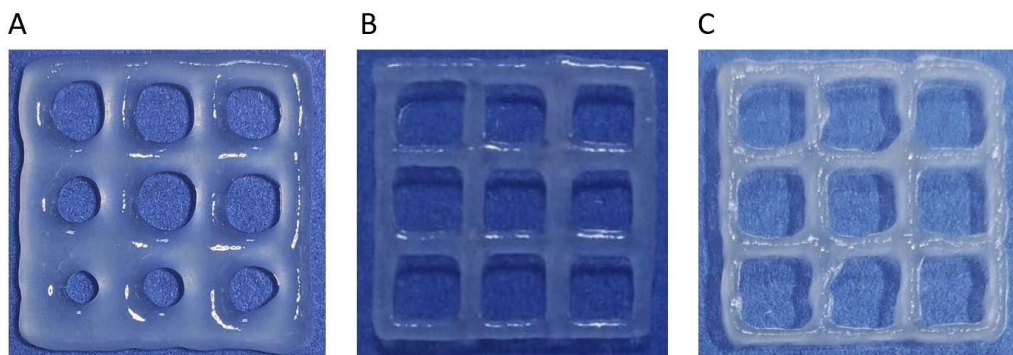


Nota. Las figuras A, B y C hacen referencia a las concentraciones de 7.5%, 6.5% y 5.5% p/v de alginato respectivamente al momento de ser extruidas por la boquilla de impresión.

De igual forma sus estados de gelación se pudieron evidenciar una vez impresas rejillas con cada tinta en donde la tinta con concentración de 5.5% p/v de Alg en estado subgelado, presentó una forma circular en los poros interno de la rejilla, ver figura 11 inciso A, a comparación de la tinta con concentración de 7.5% en donde se evidencia la formación de los poros internos con forma cuadrada. Sin embargo, el filamento observado presenta grumos y discontinuidades, ver figura 11 inciso B. Caso contrario presentado con la tinta de biomaterial al 6.5% p/v de Alg, en donde se evidencia la forma cuadrada de los poros y un trazo continuo sin grumos. Por estos motivos, se escogió la concentración de 6.5% p/v de Alg.

Figura 11.

Impresión de rejillas al 5.5% p/v, 6.5% p/v y 7.5% p/v de Alginato.



Nota. Prueba de extrusión de filamento para la tinta con AH. Las figuras A, B y C hacen referencia a las concentraciones de 5.5% p/v, 6.5% p/v y 7.5% p/v de Alginato.

Una vez seleccionada la concentración de alginato que presenta las mejores características de impresión, se pasa a observar cómo esta puede ser afectada por el ácido hialurónico evaluando las concentraciones de 1% p/v, 3% p/v y 5% p/v de AH, manteniendo la concentración del Alg en 6.5% p/v.

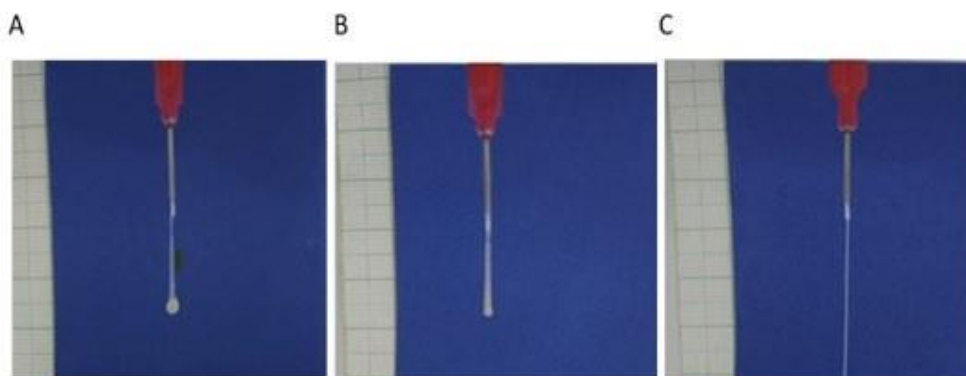
En todas las muestras realizadas con concentración de 1% AH se puede observar la formación de un filamento de poca longitud, como se observa en la Figura 12-A, obteniendo un inicio de filamento en forma de gota que demuestra un estado subgelado. En este punto se retrocede en el avance logrado con la tinta de 6.5% p/v de alginato, ya que posee filamentos con menor uniformidad y longitud (< 10 mm) en comparación con la TC. A partir de estos descubrimientos se decide continuar con la concentración de AH a 3% p/v.

Con la concentración de 3% de AH en la figura 12-B se observa un aumento en la gelación y longitud del filamento. Sin embargo, aún no se consigue un estado de gelación adecuado ya que

en algunas partes del filamento se observan inconsistencias en el estado de gelación de la tinta, lo que impide llegar al escenario ideal.

Figura 12.

Extrusión de filamento de la tinta con PPP, alginato 6.5% p/v y AH al 1% p/v, 3% p/v y 5% p/v.

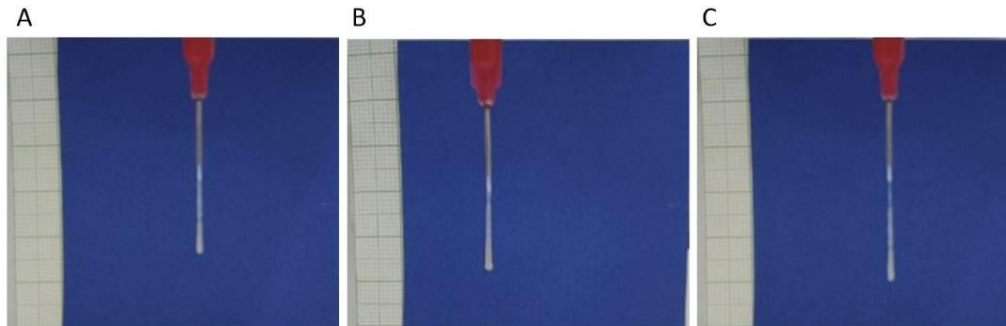


Nota. Las figuras A, B y C hacen referencia a las muestras al 1% p/v, 3% p/v y 5% p/v de AH respectivamente.

A pesar de la muestra hallada en la figura 12-B se observa alta variabilidad entre cada experimento con la concentración de 3% de AH, en donde se presentan tanto muestras subgeladas (ver Figura 13-B) como sobregeladas (Figura 13-A/C), por lo que se decidió continuar con la concentración de 5% de AH.

Figura 13.

Extrusión de filamento de la tinta con PPP, alginato 6.5% y AH al 3%.



Nota. Las figuras A, B y C hacen referencia a las muestras 1, 2 y 3 respectivamente.

Luego de realizar el debido registro y análisis fotográfico, y teniendo en cuenta las características del filamento (como continuidad y morfología) y estado de gelación se obtuvo un filamento de mayor longitud (> 30 mm), un estado de gelación adecuado y una uniformidad superior con la tinta de AH al 5%, ver figura 12-C, a las mostradas con las concentraciones de 1% AH p/v y 3% AH p/v; por lo que se puede afirmar que de todas las concentraciones planteadas la concentración al 5% de AH fue la que presentó las mejores características en su filamento y un estado correcto de gelación.

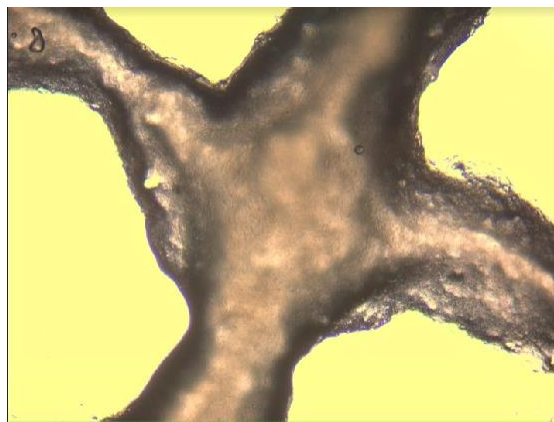
Prueba de fusión de filamento

Las pruebas de fusión de filamento se llevaron a cabo de manera conjunta con las de extrusión de filamento, con el fin de comparar los resultados y a partir de esto definir las concentraciones para la tinta de biomaterial a evaluar. Primero se llevaron a cabo las pruebas de fusión de filamento de las posibles tintas de control compuestas con 5.5%, 6.5% y 7.5% de alginato, iniciando con 5.5% de Alginato.

Como se observa en la figura 14, no se logra distinguir entre un filamento y otro, lo cual impide la impresión de estructuras de gran altura. También se logra observar filamentos de mala calidad (curvilíneos) que no mantienen el grosor del filamento. Por lo cual se continuo con la realización de la misma prueba para la tinta control con 6.5% p/v y 7.5% p/v de Alg.

Figura 14.

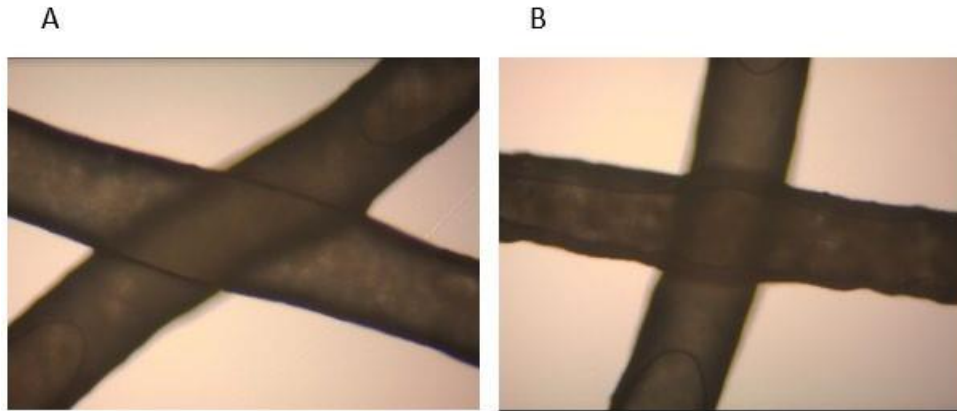
Imagen representativa de fusión de filamento tinta control al 5.5% de alginato.



Distinto a lo sucedido con la tinta control de 5.5% de alginato, las pruebas de fusión de filamento para 6.5% y 7.5% de alginato presentó una sobreposición de los filamentos de manera clara, ver figura 15. Para poder decidir cuál tinta de biomaterial presentaba las mejores características, se observa la longitud y morfología de los filamentos. El filamento de 6.5% p/v de alginato mantiene una longitud uniforme, lo cual se puede evidenciar en sus bordes; distinto a lo sucedido con el filamento a 7.5% p/v de alginato que muestra irregularidades debido a la sobre gelación que presenta la tinta cuando se aumenta la concentración de alginato. Concluyendo que la concentración de alginato que presenta mejores características es la de 6.5% p/v.

Figura 15.

Imagen representativa de fusión de filamento tinta control al 6.5% y 7.5% p/v de alginato.

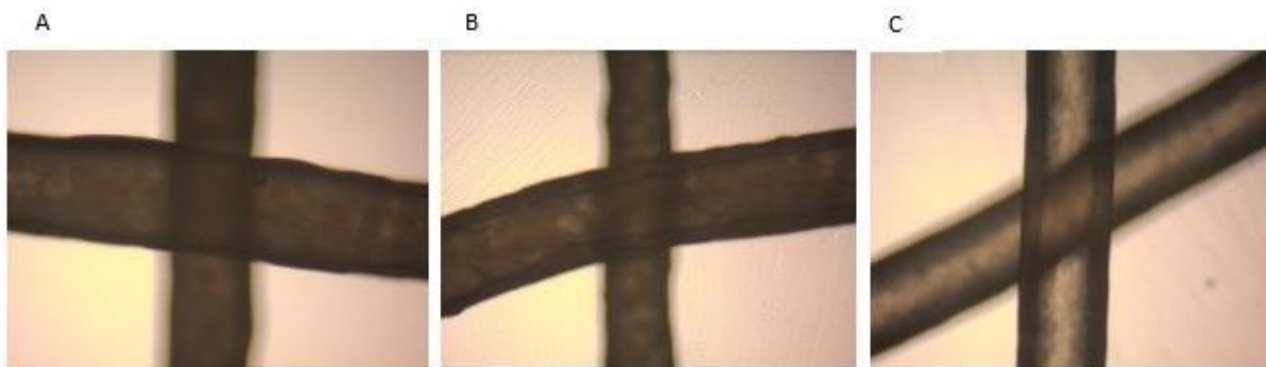


Nota. A. Filamentos con tinta control al 6.5%. B. Filamentos con tinta control al 7.5% p/v.

En la prueba de fusión de las tintas control con AH, todas presentaron sobreposición del filamento; con la diferencia de que en la concentración de 1% y 3% aparecen nuevamente sobre gelaciones. Al evaluar la concentración de 5% AH se obtiene un filamento uniforme en toda su longitud que se sobrepone de manera clara uno sobre otro sin afectar las características de cada uno, ver figura 16. Se define la tinta a usar para las pruebas post-reticulación, colapso, degradación y mecánicas, ya que se determinan las concentraciones de Alginato y AH a las cuales se obtiene mejor longitud y uniformidad del filamento, así como la creación de estructuras a partir de la sobreposición de filamentos. Dando por cumplido el objetivo de establecer las concentraciones de alginato pre-reticulado, ácido hialurónico y plasma pobre en plaquetas para la obtención de un filamento imprimible.

Figura 16.

Fotografías representativas de fusión de filamento tinta control con AH.



Nota. Las figuras A, B y C hacen referencia a las concentraciones de 1%, 3% y 5% p/v de AH respectivamente.

Obtención de los parámetros de impresión que permitan obtener un filamento imprimible.

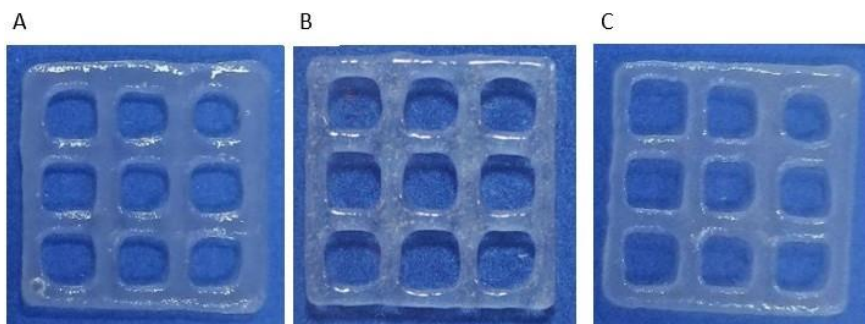
Para poder definir los mejores parámetros se tomaron en cuenta cuatro parámetros de impresión (Load before print, temperatura del cabezal de impresión, Fill density y retraction distance), se realizaron tres impresiones de tres muestras cada una, variando los parámetros y tomando registros fotográficos para la obtención de graficas de análisis estadístico que permitirán ver como varía la tasa de difusión, la imprimibilidad y el error de impresión en función a los parámetros de impresión. Para el error de área se seleccionan los porcentajes más bajos y en la tasa de difusión junto con la imprimibilidad se seleccionaron los valores más cercanos a 1; todo esto con el objetivo de evaluar la fidelidad de impresión de la tinta de biomaterial bajo condiciones de pre y post reticulación al variar diferentes condiciones de impresión.

Como se observa en la figura 17, ninguna de las muestras mantiene la forma exacta diseñada en el CAD (la cual es una rejilla compuesta de nueve poros o cuadrados); por el contrario, a simple vista se observa la formación de círculos o cuadrados en los que no se definen las esquinas. Es por eso por lo que se decide encontrar nuevos parámetros que ayuden a mejorar la calidad de la impresión.

Con el objetivo de observar la influencia de la temperatura del cabezal en la calidad impresión, se evalúa la temperatura del cabezal (a 20°C. y 4°C) y el parámetro Load before print de manera conjunta.

Figura 17.

Muestras de impresión con parámetros planteadas en la tesis Eraso, N., & Gómez, J. (2021)



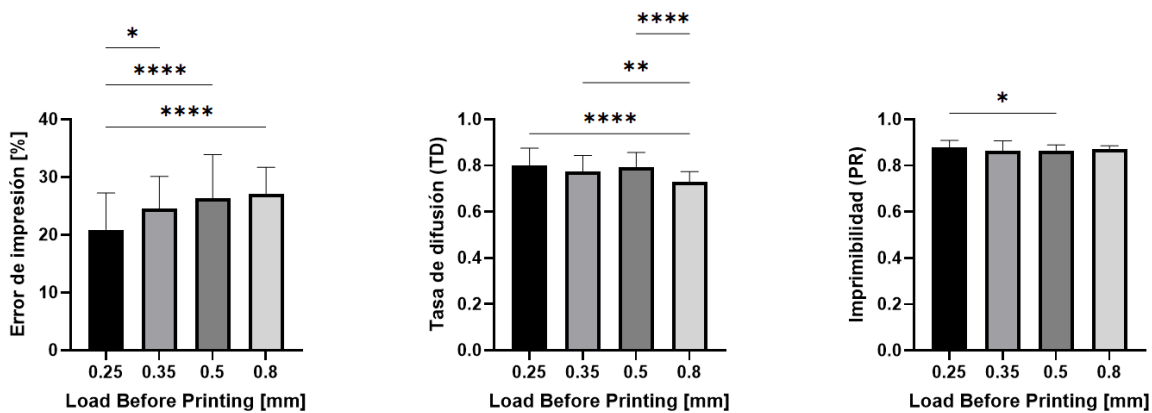
Nota. Las figuras A, B y C hacen referencia a tres muestras distintas con los parámetros de impresión utilizados en la tesis Eraso, N., & Gómez, J. (2021).

De los parámetros probados (0.25 mm, 0.35 mm, 0.5 mm y 0.8 mm) se observa que a medida que aumenta la LBP (Load before print) suministrada al émbolo antes de la impresión, aumenta el error de impresión, ver figura 18. La impresión inicia con un error del 20% que aumenta hasta superar el 25%. Aunque en las mediciones de tasa de difusión e imprimibilidad

los parámetros de 0.25 mm y 0.35 mm no presentan una diferencia significativa, el parámetro de 0.25 mm muestra un menor impacto en las impresiones realizadas, ya que se tendría que afectar en menor medida la LBP suministrada al émbolo.

Figura 18.

Gráficas de error de impresión, tasa de difusión e imprimibilidad del parámetro load before printing con el extrusor de impresión a 20°C.

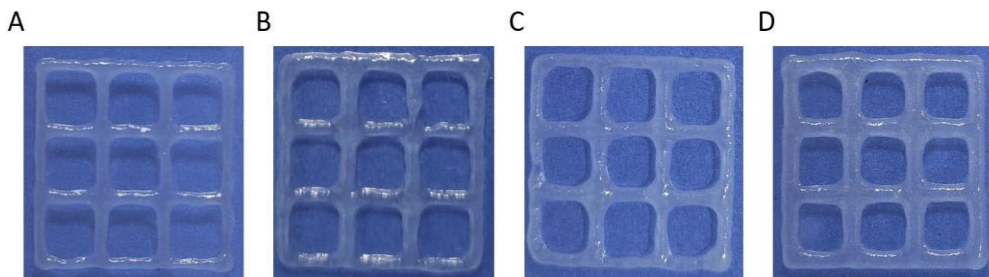


Nota. Los datos fueron reportados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía como el promedio \pm error estándar para $n = 3$. Las diferencias estadísticas están representadas por: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

De manera cualitativa se observa en la figura 19, que a medida que aumenta el valor del LBP, aumenta la carga inicial de la impresión, lo que genera a su vez un aumento en el flujo de tinta que sale por la boquilla influyendo de manera directa en el diámetro del filamento; es por eso que se observa una mejor definición de los cuadros internos en la impresión con un LBP más bajo (0.25 mm).

Figura 19.

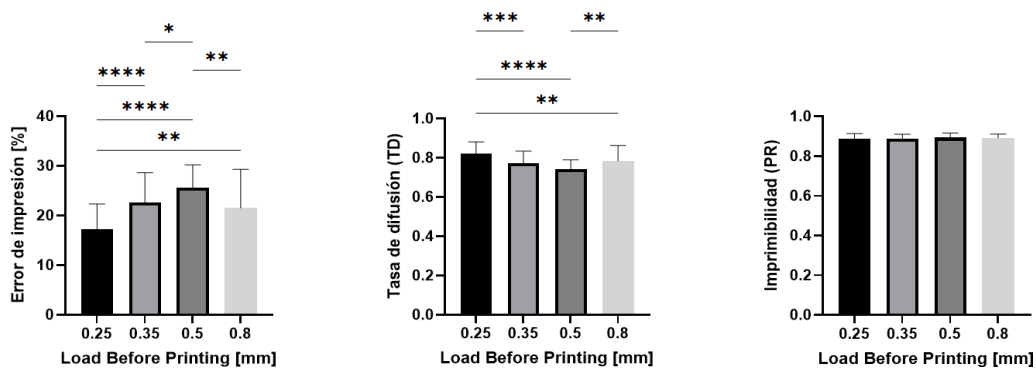
Impresión 20°C de la rejilla con el parámetro Load Before Print.



Nota. Las figuras A, B, C y D hacen referencia a las muestras con el parámetro Load Before Print configurado a 0.25 mm, 0.35 mm, 0.5 mm y 0.8 mm respectivamente.

Figura 20.

Gráficas de error de impresión, tasa de difusión e imprimibilidad del parámetro load before printing con el cabezal de impresión a 4°C.

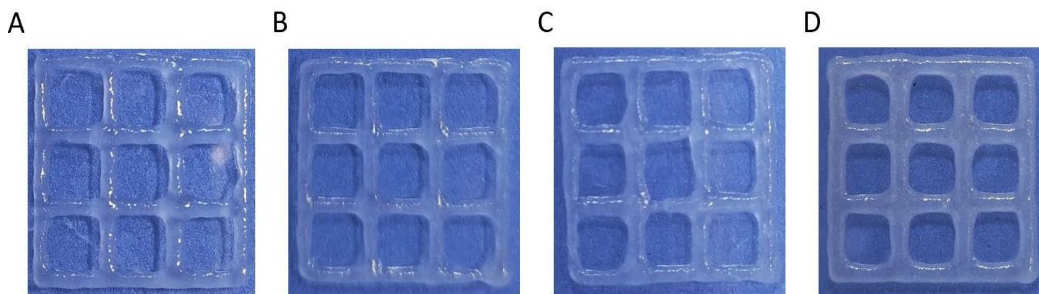


Nota. Los datos fueron reportados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía como el promedio \pm error estándar para $n = 3$. Las diferencias estadísticas están representadas por: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

Con el fin de contrastar los resultados obtenidos con el extrusor de impresión a 20 °C, se pasa a evaluar los mismos valores de LBP con el extrusor de impresión a una temperatura de 4 °C. Los parámetros mostraron que la tasa de difusión disminuye a medida que aumenta la carga inicial que se aplica al émbolo, ver figura 20. En la gráfica de imprimibilidad se puede observar que no hay diferencias significativas entre las muestras. Con el experimento realizado a 4°C se ratifica que el valor del parámetro LBP que arroja los mejores resultados es el de 0.25 mm, al igual que en el experimento realizado a 20°C, ver figura 20; ya que para ambas temperaturas de cabezal se obtienen menor error de impresión y mayor imprimibilidad cuando se utiliza un LBP de 0.25 mm, observando en la figura 21 como a medida que se aumenta el valor de este parámetro los poros de la impresión pierden su forma cuadrada.

Figura 21.

Impresión 4°C de la rejilla con el parámetro Load Before Print.

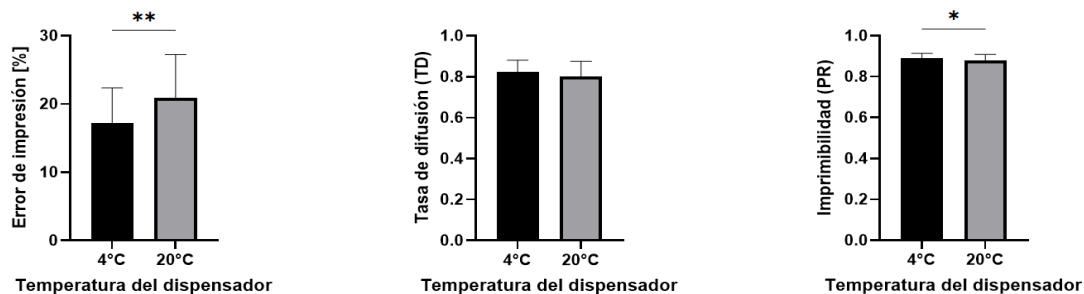


Nota. Las figuras A, B, C y D hacen referencia a las muestras con el parámetro Load Before Print configurado a 0.25, 0.35, 0.5 y 0.8 respectivamente.

Las impresiones a 20°C y 4°C no muestran una diferencia significativa entre sus TD y PR, sin embargo, el error de impresión presentó menor valor al usar el cabezal de impresión a 4°C en comparación con el cabezal de impresión a 20°C, ver figura 22. Para tomar una decisión se observaron las figuras 21 y 19, inspeccionando de manera cualitativa la forma de los poros en función de la temperatura del cabezal, se observó en la figura 21 que se mantiene una forma del poro más cuadrada a pesar del aumento del LBP, esto debido a que una menor temperatura ayuda a la gelificación de la tinta, que a su vez impide la fusión de las capas causando que la estructura impresa disminuya su error de impresión. A partir de los experimentos realizados y los resultados obtenidos se definen dos parámetros: el load before print en 0.25 mm y la temperatura del cabezal a 4°C. Estos parámetros se mantienen fijos, y se continúa con la prueba en otros parámetros con la intención de aumentar la fidelidad de impresión hallada en el experimento anterior.

Figura 22.

Gráficas de error de impresión, tasa de difusión e imprimibilidad del parámetro load before printing de las temperaturas de 20°C y 4°C.



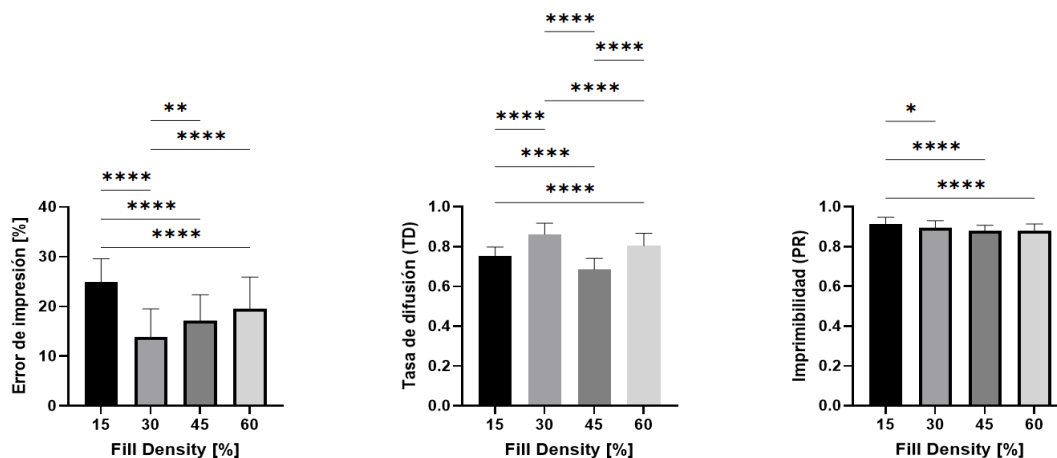
Nota. Los datos fueron reportados mediante un análisis t-student como el promedio \pm error estándar para $n = 3$. Las diferencias estadísticas están representadas por: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

Parámetro Fill Density

El tercer parámetro evaluado fue Fill Density. Este parámetro afecta la cantidad de tinta que va a salir por la boquilla a medida que se desarrolla la impresión respecto a la relación de llenado de la figura del diseño CAD a imprimir. Se tuvieron en cuenta los siguientes valores de fill density para la impresión: 15 %, 30 %, 45 % y 60 %. Dentro de los parámetros observados, ver figura 23, cuando se imprime con 30% de Fill Density se obtenían los resultados más bajos de error de impresión, así como la relación de tasa de difusión más cercana a uno.

Figura 23.

Gráficas de error de impresión, tasa de difusión e imprimibilidad del parámetro Fill Density luego de seleccionar el parámetro de Load Before Print y la temperatura del cabezal de impresión.

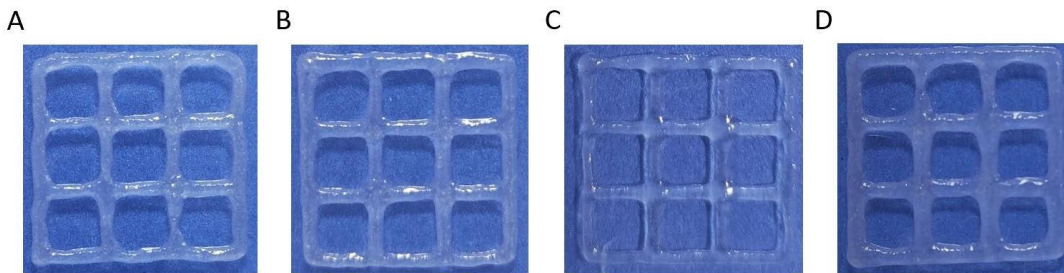


Nota. Los datos fueron reportados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía como el promedio \pm error estándar para $n = 3$. Las diferencias estadísticas están representadas por: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

De manera cualitativa, se observa un aumento el grosor del filamento a medida que se aumenta el porcentaje de Fill density. Por lo cual se decidió buscar un punto medio en el cual no se aumente drásticamente el grosor del filamento pero que tampoco se disminuya al punto de que cause impresiones con irregularidades o partes faltantes en los trazos lineales de la rejilla, como sucede cuando se tiene un porcentaje de 15% en fill density. Respecto a los demás parámetros evaluados se observa que al aumentar el porcentaje de Fill Density se eliminan las irregularidades en el trazo, sin embargo, al generar un mayor relleno en la impresión se promueve la fusión de capas generando que se pierda la forma cuadrada de los poros de la rejilla como se observa en la figura 24 incisos C y D, es por eso que, juntando el análisis cualitativo y cuantitativo, se seleccionó un fill density de 30%.

Figura 24.

Impresión de la rejilla con el parámetro Fill Density.



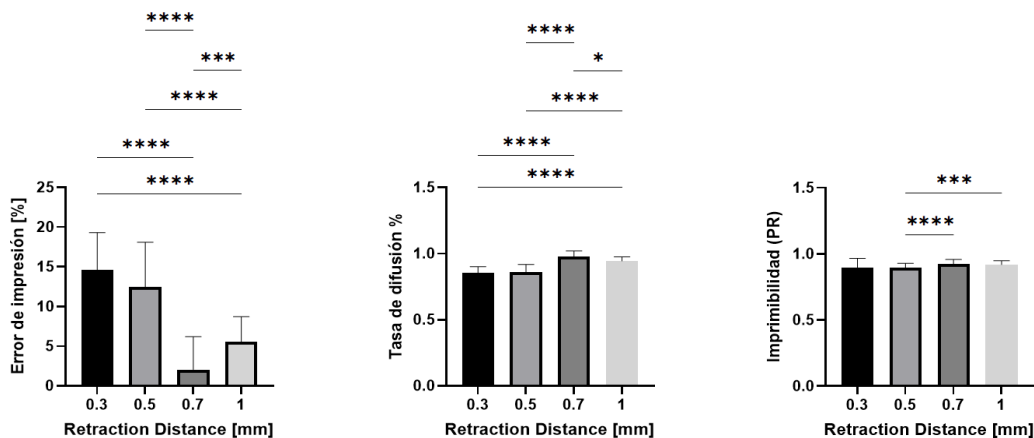
Nota. Las figuras A, B, C y D hacen referencia a las muestras con el parámetro Fill Density configurado a 15%, 30%, 45% y 60% respectivamente.

Parámetro Retraction Distance.

El cuarto y último parámetro para evaluar fue Retraction Distance. Este parámetro define la distancia de retracción del módulo de extrusión de la impresora al momento de pasar de un lugar ya impreso a un espacio donde no se ha imprimido. Esto influye en la manera en que se aleja la boquilla de teflón de la superficie en la cual se está realizando la impresión. Se evaluaron tres valores de este parámetro diferente del usado por defecto (0.7 mm), estos parámetros fueron 0.3 mm, 0.5 mm y 1 mm. Dos valores inferiores al valor original y uno superior. En la figura 25, se puede observar que para el error de impresión se obtuvieron los valores más bajos (5%) con el parámetro por defecto, mientras en los demás parámetros fue igual o superior a este valor. Esto sucede de igual forma con la tasa de difusión y la imprimibilidad, en donde se obtuvieron los valores más cercanos a uno. La diferencia en las impresiones de cada parámetro evaluado se puede evidenciar en la figura 25. De igual forma se evidencia de forma cualitativa que la impresión con 0.7 mm de parámetro presentó los poros más cuadrados, ver figura 26.

Figura 25.

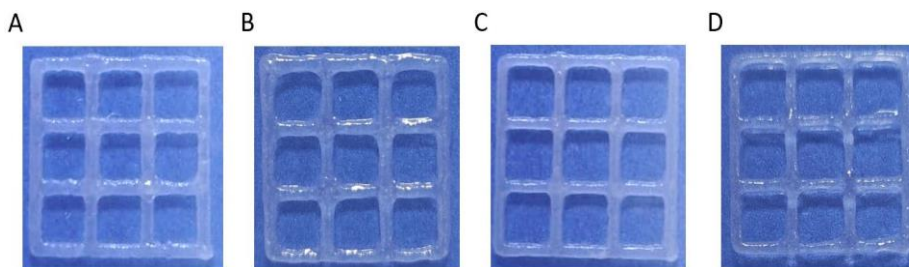
Gráficas de error de impresión, tasa de difusión e imprimibilidad del parámetro Retraction Distance, luego de seleccionar el parámetro para Load Before Print, temperatura del cabezal de impresión y Fill Density.



Nota. Los datos fueron reportados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía como el promedio \pm error estándar para $n = 3$. Las diferencias estadísticas están representadas por: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

Figura 26.

Impresión de la rejilla con el parámetro Retraction Distance.



Nota. Las figuras A, B, C y D hacen referencia a las muestras con el parámetro Retraction Distance configurado a 0.3 mm, 0.5 mm, 0.7 mm y 1 mm respectivamente.

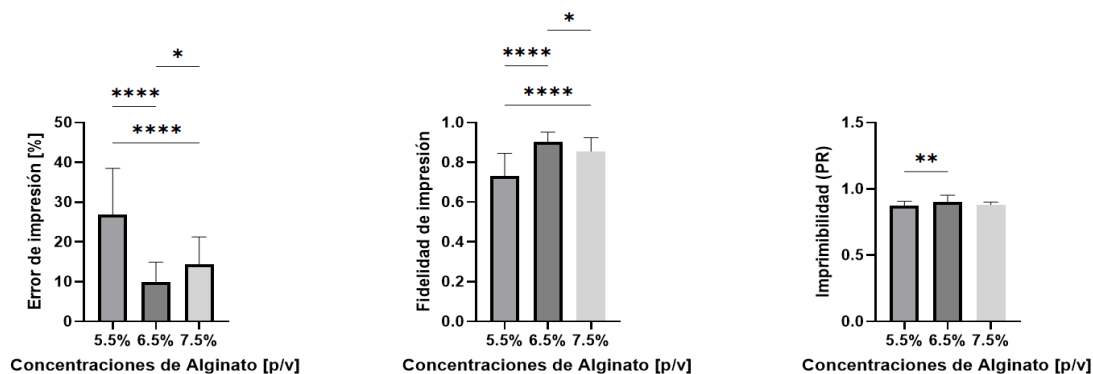
Con los parámetros previamente seleccionados se llevaron a cabo pruebas de impresión, variando la concentración de Alg y AH, pruebas que permitieron ratificar que la concentración de la tinta definida inicialmente en las pruebas de extrusión y fusión de filamento tuvieron la mayor fidelidad de impresión después de haber variado los parámetros iniciales. Esto con el fin de definir los parámetros de impresión de la tinta de biomaterial a utilizar en las pruebas finales de reticulación, degradación, colapso y pruebas mecánicas. Se realizaron impresiones con alginato observando el porcentaje de error de impresión, PR y TD según la concentración de alginato evaluando 5.5% p/v, 6.5% p/v y 7.5% p/v.

Parámetro concentración de alginato.

Inicialmente se imprimieron rejillas variando la concentración de alginato, se tomaron las concentraciones de 5.5%, 6.5% y 7.5% p/v para determinar la tinta control a utilizar, ver figura 27. Se evidenció que la concentración de 6.5% de alginato presenta una diferencia significativa en términos de su error de impresión, fidelidad de impresión e imprimibilidad. Esta diferencia concuerda con el resultado obtenido en la prueba de extrusión de filamento en el que la tinta de biomaterial con 6.5% de Alg p/v presentó un filamento en el estado correcto de gelación, evidenciándose en el trazo de impresión de la rejilla, ver figura 28 inciso B. En las impresiones presentadas se observó de igual forma (que en la prueba de extrusión de filamento) la formación de poros circulares en la concentración de 5.5% p/v de Alg, y los grumos en los poros de la concentración de 7.5% de Alg, ver figura 280 inciso A y C respectivamente.

Figura 27.

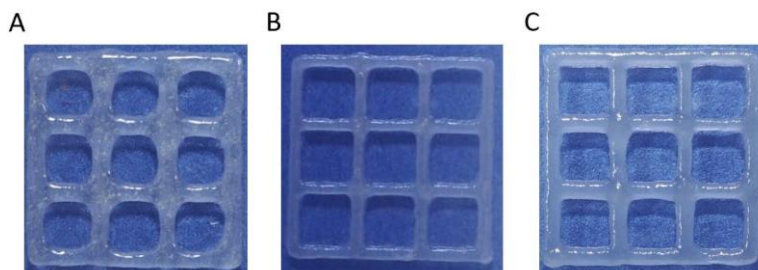
Gráficas de error de impresión, tasa de difusión e imprimibilidad variando la concentración de Alginato luego de seleccionar todos los parámetros de impresión.



Nota. Los datos fueron reportados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía como el promedio \pm error estándar para $n = 3$. Las diferencias estadísticas están representadas por: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

Figura 28.

Impresión de la rejilla con los parámetros finales con la tinta de biomaterial de Alginato.



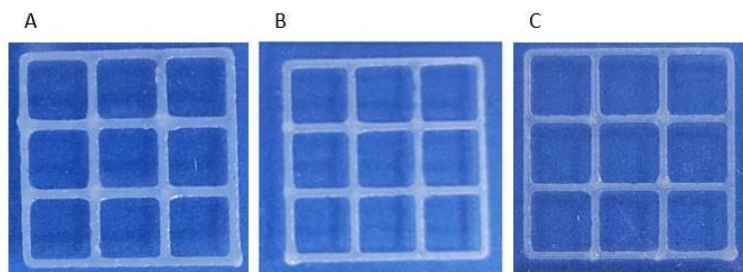
Nota. Las figuras A, B y C hacen referencia a las muestras con el Alginato al 5.5%, 6.5% y 7.5% p/v respectivamente.

Tinta con ácido hialurónico.

Una vez seleccionada la tinta control (6.5% p/v), se procede a realizar la cuantificación de la fidelidad de impresión utilizando la tinta de biomaterial al 1%, 3% y 5% p/v de AH y utilizando como solvente el PPP, ver figura 29.

Figura 29.

Impresión de la rejilla con los parámetros finales de la tinta de biomaterial con AH.

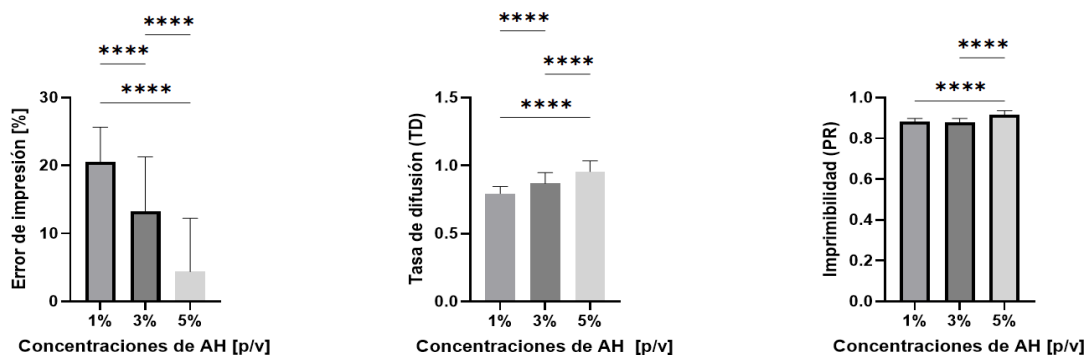


Nota. Las figuras A, B y C hacen referencia a las muestras con AH al 1%, 3% y 5% p/v respectivamente.

Se realizó la cuantificación de el error de impresión, la tasa de difusión e imprimibilidad. Esto permitió observar que al aumentar la concentración de AH se obtiene un error de impresión menor, así como una tasa de difusión cercana a 1 y una mayor imprimibilidad, ver figura 30.

Figura 30.

Gráficas de error de impresión, tasa de difusión e imprimibilidad variando la concentración de AH luego de seleccionar todos los parámetros de impresión y la concentración de Alg.



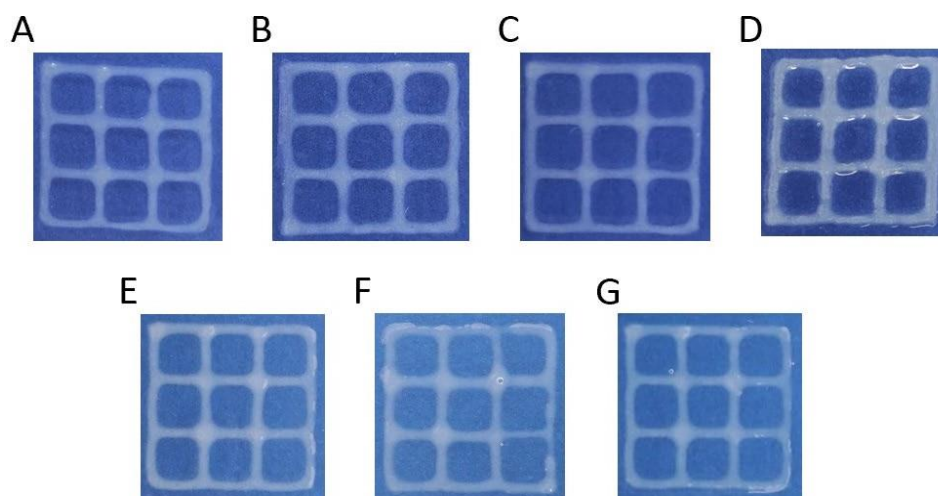
Nota. Los datos fueron reportados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía como el promedio \pm error estándar para $n = 3$. Las diferencias estadísticas están representadas por: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

Post-reticulación de la tinta control.

Una vez determinada la tinta control (TC) y la tinta seleccionada (TS), se procedió a determinar el tiempo de reticulación en el que se estabilizaba la fidelidad de impresión. Esto se realizó mediante el procesamiento de las imágenes de las rejillas y todos los parámetros de impresión seleccionados, en diferentes tiempos de reticulación (10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h), ver figura 31.

Figura 31.

Impresión de la rejilla en Post Reticulación de la tinta control.

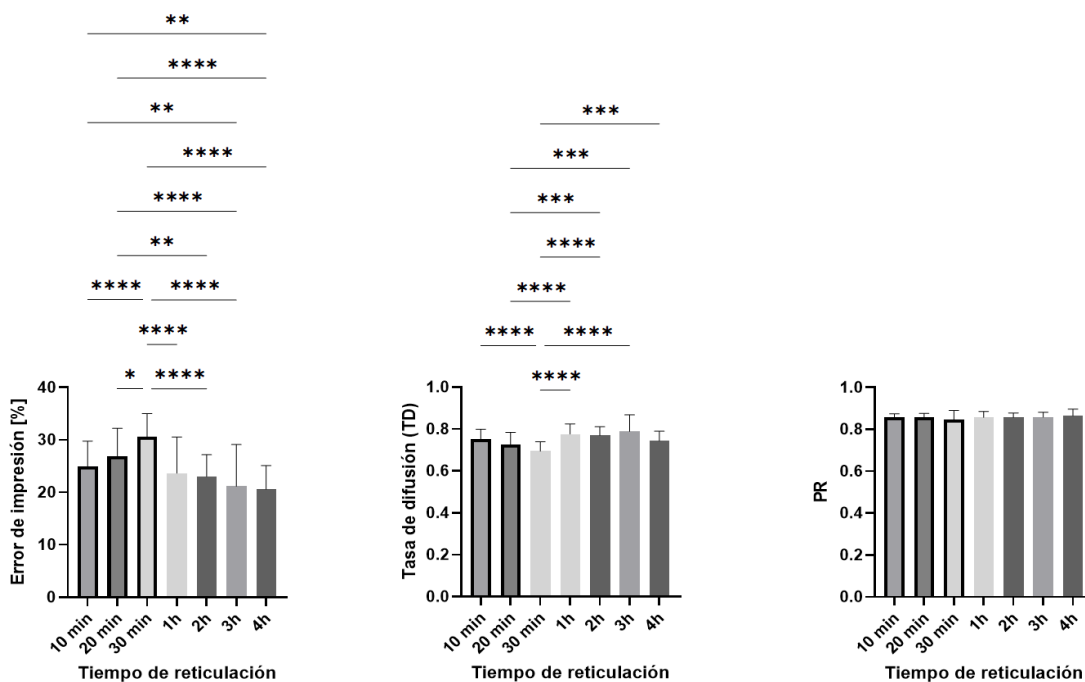


Nota. Las figuras A, B, C, D, E, F y G hacen referencia Al tiempo utilizado para reticular la rejilla siendo 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h.

Se observó que a partir de la primera hora de reticulación el error de impresión y la tasa de difusión no presentaron diferencias significativas con las horas siguientes, por lo que permanecían estables hasta el fin del experimento, ver figura 32.

Figura 32.

Gráficas de error de impresión, tasa de difusión e imprimibilidad variando el tiempo de reticulación para la tinta control.



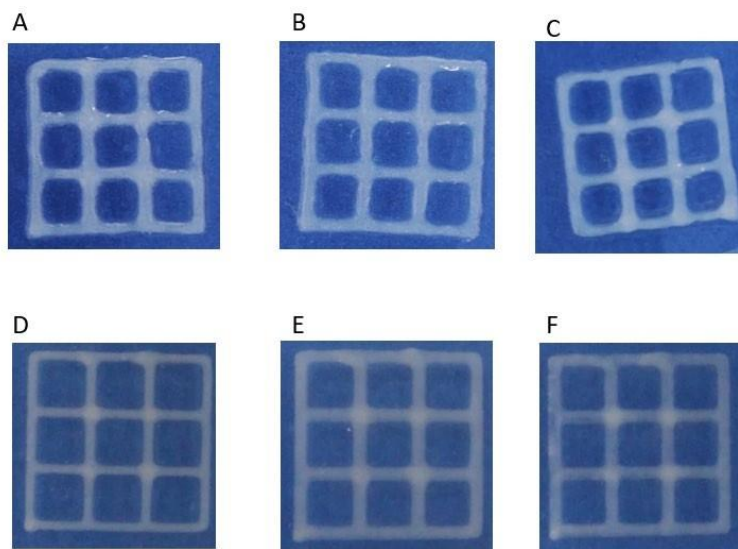
Nota. Los datos fueron reportados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía como el promedio \pm error estándar para $n = 3$. Las diferencias estadísticas están representadas por: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

Post-reticulación de la tinta con ácido hialurónico.

Una vez seleccionado el tiempo de reticulación (1h), se generó la reticulación de la TS (6.5% Alg p/v y 5% AH p/v). Como se observa en la Figura 33, las rejillas de los incisos D-E-F presentaron una mejor definición de los cuadrados internos y menos exceso de tinta de biomaterial en comparación con la TC, ver Figura 33 inciso A, B y C.

Figura 33.

Impresión de la rejilla en Post Reticulación de la tinta con AH.

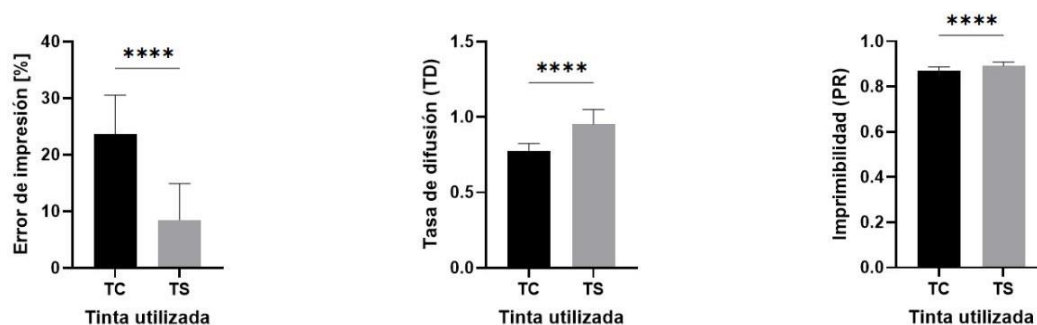


Nota. Las figuras A, B, C hacen referencia a las muestras 1, 2 y 3 realizadas con la tinta control. Las figuras D, E, F hacen referencia a las muestras 1, 2 y 3 realizadas con la tinta y parámetros seleccionados.

Se analizaron los datos recolectados en la figura 34, y se compararon con los resultados obtenidos en la post reticulación de la TC. Se evidenció que en ambas existe un aumento del error de impresión, sin embargo, la TS mantiene un error de impresión inferior al 10% a comparación de la TC que alcanza valores superiores al 20%. De igual forma la TS presenta mayor tasa de difusión e imprimibilidad que la TC.

Figura 34.

Gráficas de error de impresión, tasa de difusión e imprimibilidad variando el tiempo de reticulación para la tinta con AH.



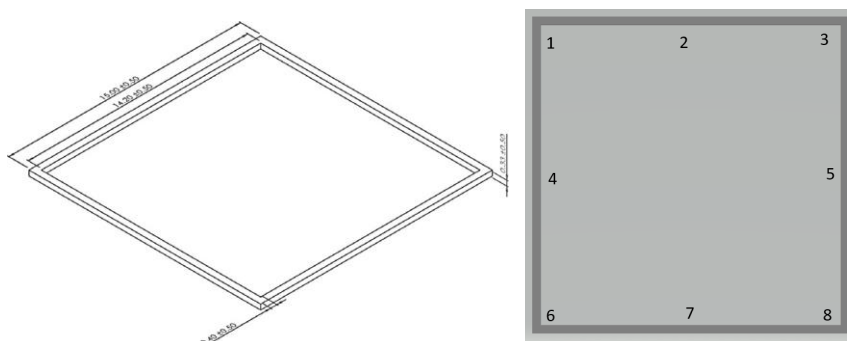
Nota. Los datos fueron reportados mediante un análisis t-student como el promedio \pm error estándar para $n = 3$. Las diferencias estadísticas están representadas por: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

Prueba de colapso

Se realizó la impresión de las rejillas con 3 capas, cada capa con un grosor de 0.33 mm. Se tomaron medidas de la altura obtenida en la impresión, teniendo en cuenta las posiciones seleccionadas en la figura 35, y se comparó con la altura teórica que se encontraba en el diseño CAD para determinar que tanto se funden o colapsan las capas.

Figura 35.

Diseño CAD para pruebas de colapso y enumeración de medidas de altura.

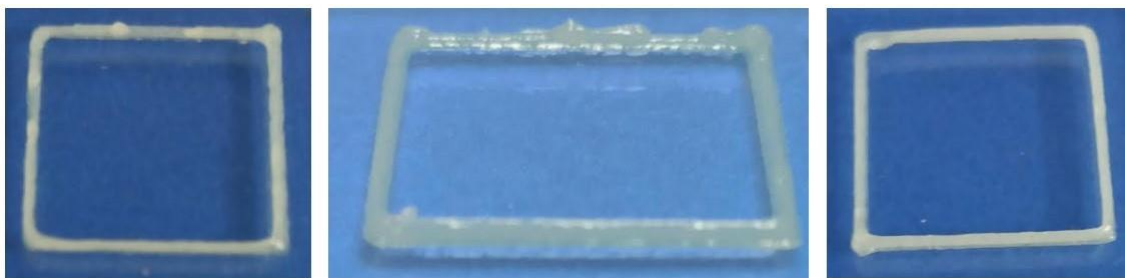


Nota. Las medidas están en mm.

Como se puede observar en la Figura 36, la rejilla de tres capas adquiere mayor altura en las esquinas de la impresión, pero en los lapsos entre ellos disminuye su altura, esto debido a que las esquinas son la parte más estable de toda la estructura y donde se deposita más material.

Figura 36.

Fotografías de distintas muestras de prueba de colapso de tres capas.

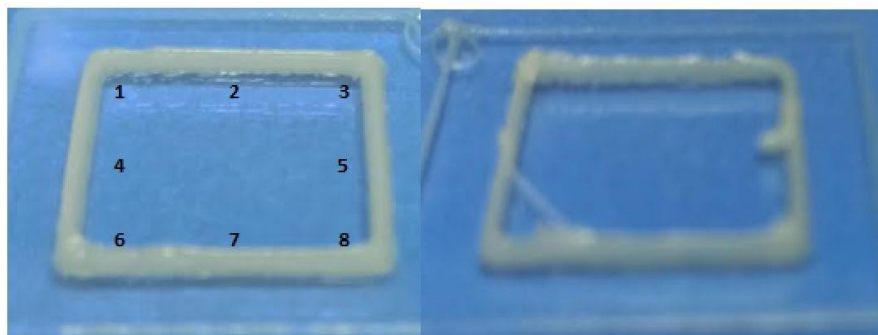


Se aumenta el número de capas a cinco para la prueba de colapso y se encontraron valores de porcentaje de error de hasta 50 % en las esquinas de la impresión. En las zonas 2, 4, 5 y 7 se obtienen mayores porcentajes de error como 77.6%. Se comienzan a observar cúmulos de

tinta en la punta de la boquilla que arrastran parte de la impresión que se encontraba en un buen estado. ver figura 37.

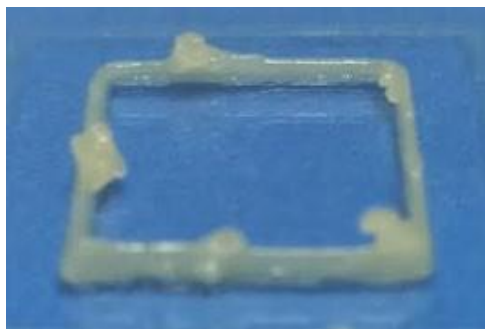
Figura 37.

Fotografías de distintas muestras de prueba de colapso de cinco capas.



En la prueba de colapso de siete capas se evidencia un error de flujo de impresión que causa la formación de cúmulos de tinta que destruyen o arrastran partes de la estructura que se encuentran en buen estado, como se muestra en la Figura 38, lo que se ve reflejado en porcentajes de error de hasta 92.2%.

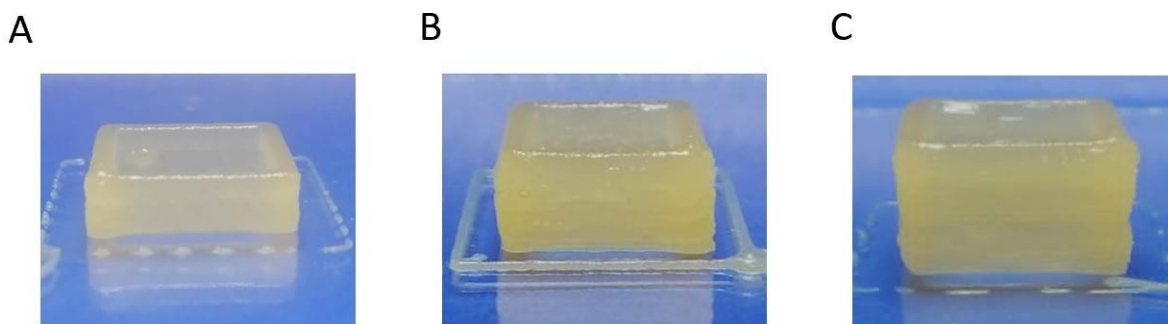
Figura 38.



Para solucionar el problema de las siete capas, se modificó el parámetro de diámetro de filamento, pasando de ser 13 mm a 8 mm. Este cambio según la descripción del software incrementaría el flujo del material a través de la boquilla. De igual forma, se eliminó la punta de teflón para aumentar el diámetro de extrusión del filamento. Estos cambios permitieron generar impresiones inicialmente con la TC con 13, 20 y 35 capas sin observar colapso, ver figura 39.

Figura 39.

Impresión TC a 13, 20 y 35 capas.

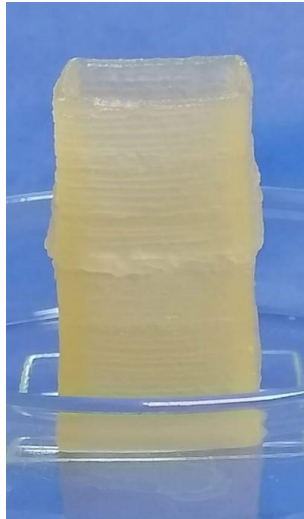


Nota. La altura de cada capa fue fijada a 0.33 mm. A. TC con 13 capas. B. TC con 20 capas. C. TC con 35 capas.

Al tener éxito en imprimir más de siete capas, se procedió a encontrar la capa de colapso de la tinta de control. La cantidad de capas alcanzada por la TC fue de 82 capas. Con la altura de colapso determinada de 82 capas, se procedió a imprimir 81 capas para medir su altura y compararla con el valor teórico, ver figura 40. Las mediciones realizadas mostraron que se presentaba una altura de 28.58 mm, y comparándola con el valor teórico (26.73 mm) se encontró un error del 7.79%.

Figura 40.

Impresión del cuadrado con 81 capas TC antes de colapso.



Una vez conocida la cantidad de capas soportadas antes de colapsar por la TC se procedió a probar el desempeño de la TS con 82 capas. La TS no logró llegar a las 82 capas, sin embargo alcanzó 30 capas justo en el colapso, como se muestra en la Figura 41.

Figura 41.

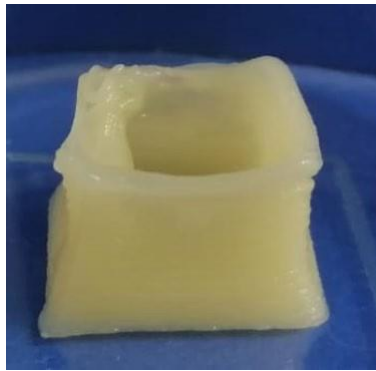
Impresión 30 capas con la TS.



Tomando este número de capas como base para experimentar con la TS, se procedió a imprimir una capa anterior, es decir 29 capas como se muestra en la Figura 42. La altura medida fue de 8.65 mm, siendo la teórica 9.57 mm se obtuvo un porcentaje de error de 9.61% en la altura de la impresión final a 29 capas.

Figura 42.

Impresión de 29 capas con la TS.



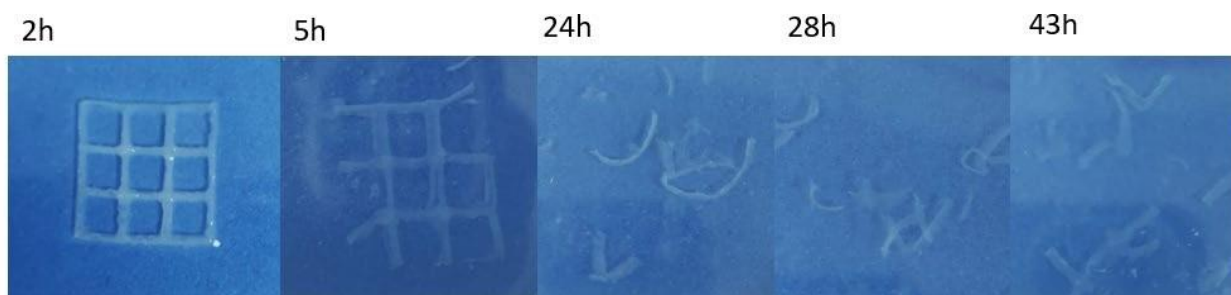
El alginato por sí solo muestra una mayor resistencia a la fusión de capas, pero reduce la calidad de la impresión, esto porque en la prueba de colapso con alginato se observaron diferencias entre la morfología de cada capa; distinto a lo sucedido con la prueba de colapso realizada con la TS, en la cual se reduce la resistencia a la fusión de filamentos en conjunto con un aumento en la calidad de los filamentos, los cuales se disponen uno sobre otro de manera uniforme dando como resultado una impresión compacta y no seccionada como la obtenida con la TC.

Prueba de degradación

Una vez elegida la TS y el tiempo de reticulación de la rejilla, se realizó la impresión en el plato de Petri. Se cuantificó las proteínas que se encuentran en cada plato luego de realizar dos lavados con 3 ml de PBS (en el primer lavado se visualiza un PBS blanco, pero en el segundo lavado el PSB posee su color usual) y transcurrir las horas de degradación seleccionadas como se muestra en la figura 43.

Figura 43.

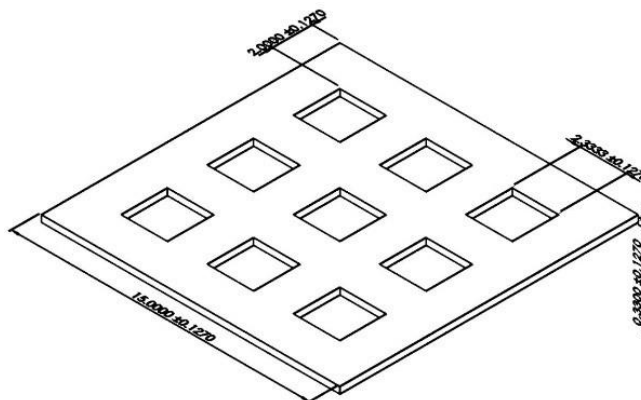
Degradación de la rejilla en sus diferentes horas de medida.



Sin embargo, como se muestran en las tablas 16 - 24 en los anexos, el equipo no logró leer la concentración de proteínas en los platos de Petri. Para confirmar este resultado, se realizó un blanco positivo (volumen de plasma en la rejilla) para conocer la concentración de proteínas totales que deberían estar degradadas en el plato de Petri. Esta concentración de proteínas también fue imperceptible para el equipo por lo cual se optó por imprimir una estructura con mayor volumen (cinco veces el volumen de la rejilla), como se muestra en la figura 44.

Figura 44.

CAD diseñado para pruebas de degradación con rejilla modificada.

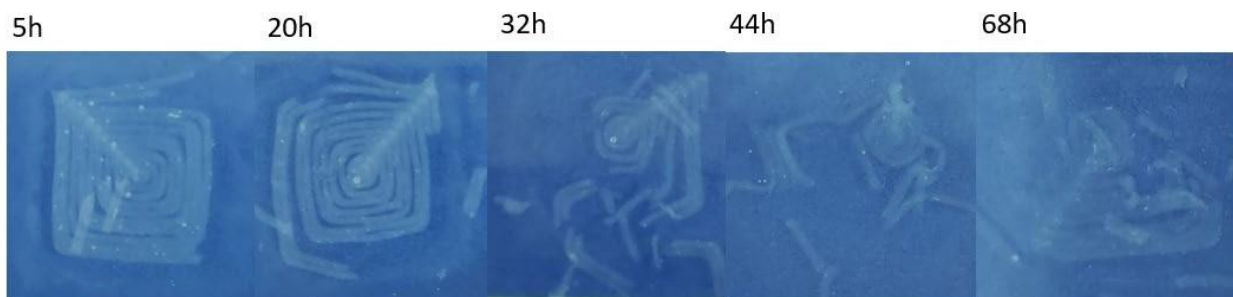


Nota. Las medidas están en mm.

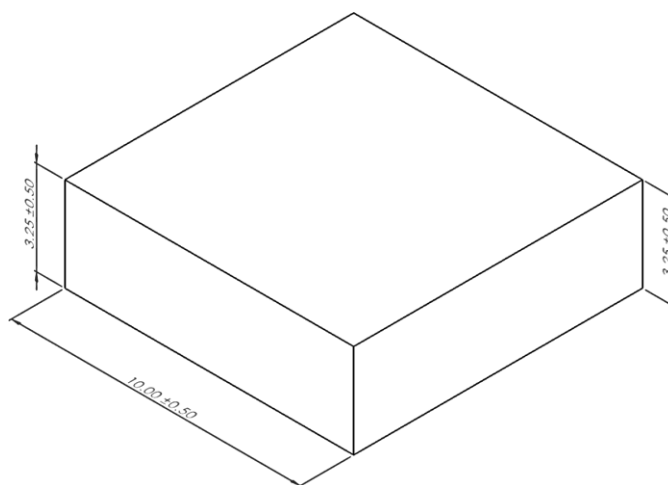
Antes de iniciar con las impresiones del nuevo CAD, se cuantificó la concentración de proteínas del blanco positivo, con la intención de conocer si en algún momento (cuando se halla degradado toda la estructura) se libera suficiente proteína para ser detectada por el NanoDrop. Sin embargo, como se muestra en las tablas 25 – 34 contradas en los anexos, el blanco fue leído con éxito, pero las demás muestras mostraban valores proteicos diversos en las diferentes horas de medición sin importar lo degradada que se encontrara la estructura como se muestra en la figura 45. Por lo cual, se prosiguió no solo aumentar el volumen de la estructura, ver Figura 46, sino también disminuir la cantidad de solvente en el que se encuentra el cubo a 3ml de PBS y ubicar las impresiones en una placa de seis pozos.

Figura 45.

Degradación de la rejilla modificada en sus diferentes horas de medida.

**Figura 46.**

Diseño de CAD cubo utilizado en las pruebas de degradación.



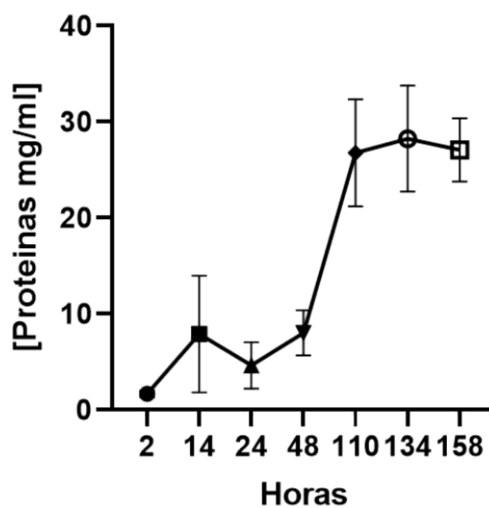
Nota. Las medidas están en mm.

Una vez impresos los nuevos diseños para degradación se reticularon las impresiones durante una hora y se traspasaron del plato de impresión a placas de cultivo de 6 pozos estériles y se añadió 3 ml de PBS 1X. Se cuantificaron las proteínas usando el equipo NanoDrop One a las 2 h, 14 h, 24 h, 48 h, 110 h, 134 h y 158 h.

Como se muestra en la Figura 47, se evidenció una rápida degradación de las estructuras impresas tornando la solución de PBS de un color crema que se hacía más intenso al pasar las horas, así como una gran cantidad de solutos que no se disolvieron completamente.

Figura 47.

Liberación de proteínas por las impresiones realizadas con la TS.

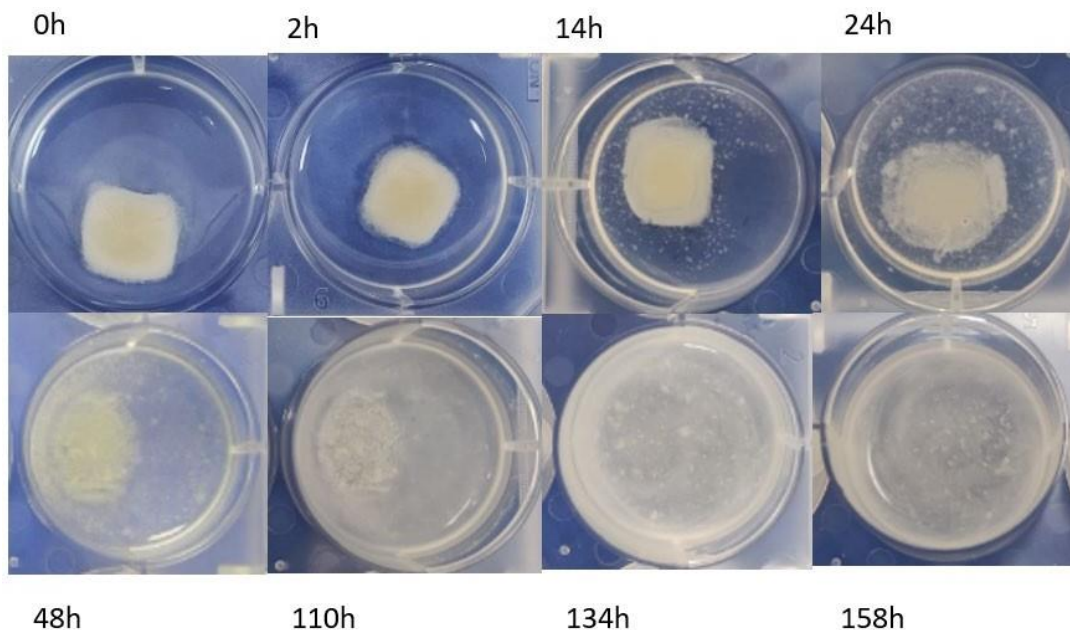


Nota. Los datos fueron reportados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía como el promedio \pm error estándar para $n = 3$.

Las mediciones de la liberación de proteínas registraron dos comportamientos, dentro de las primeras 48 h la liberación de proteínas no supero los 10 mg/ml, pasadas las 48 h se encontró una concentración cercana a 30 mg/ml que se mantuvo constante hasta finalizar el experimento, ver figura 48.

Figura 48.

Degradación del cubo en sus diferentes horas de medida.



De las 134 horas en adelante, no solo se observaba el cambio de color y presencia de solutos en las muestras, sino también un cambio en las propiedades físicas de las mismas. La muestra ya mayormente disuelta en el solvente causo el comienzo de la gelificación, volviendo la sustancia más viscosa.

Pruebas mecánicas

Para las pruebas de compresión se realizó la curva de Esfuerzo/Deformación (Strain/Stress) como se muestra en la Figura 49, con la intención de conocer algunas de las características de la TS y compararlas con las propiedades obtenidas con la TC.

Figura 49.

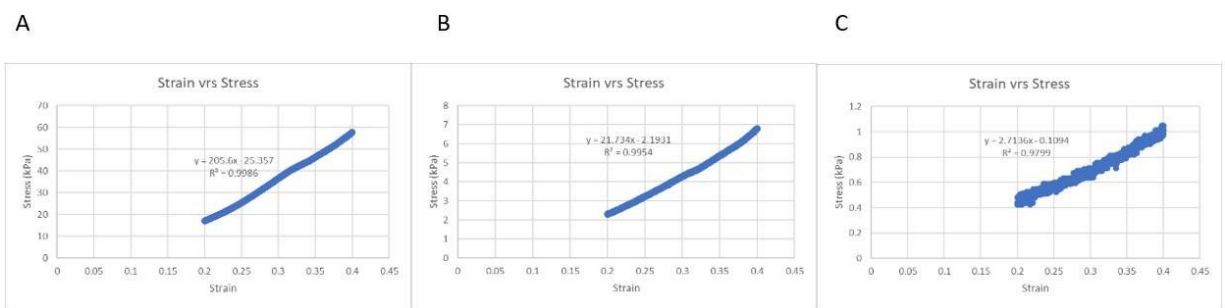
Curva Strain/Stress de compresión para la TC sin hinchamiento, con hinchamiento y TS sin hinchamiento.



Para tener un módulo de Young más acertado, se eliminaron los datos finales de la curva, ya que hacían referencia al momento en que se dejaba de ejercer fuerza sobre el cubo. También se seccionó utilizando únicamente los datos que se encontraban entre 0.2 – 0.4 en strain, con el fin de seleccionar la parte lineal de la curva en la sección de deformación elástica como se muestra en la figura 50.

Figura 50.

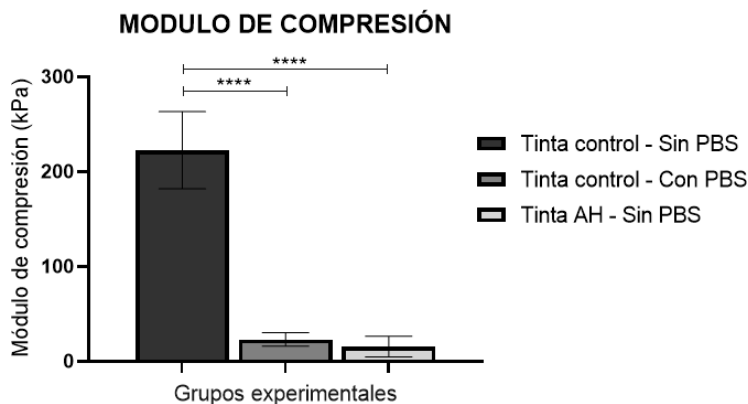
Curva Strain/Stress de compresión seccionada de 0.2 - 0.4 de strain, para tinta control sin hinchamiento, con hinchamiento y tinta AH sin hinchamiento.



Estas mismas curvas e intervalos de recta se utilizaron para las cuatro muestras de tinta control, tinta AH, con hinchamiento y sin hinchamiento. Los datos hallados en cada gráfica se encuentran en la Figura 51. Para la TC sin hinchamiento se obtuvo un módulo de Young entre 175.59 kPa – 268.78 kPa que comparado con el módulo hallado en la TC con hinchamiento (19.128 kPa – 33.834 kPa) es mucho mayor, lo cual indica que requiere de más esfuerzo para ser deformado. Debido a que la estructura es considerada un hidrogel y la impresión se deja 24 horas en PBS, comienza a degradarse y perder parte de su rigidez, logrando que se obtenga un módulo de Young menor.

Figura 51.

Módulos de Young de las diferentes muestras de TC y tinta AH.



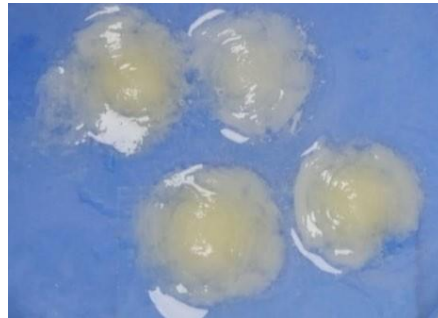
Nota. La leyenda que posee " Sin PBS" hace referencia a las impresiones que no se dejaron en hinchamiento con PBS. De igual forma el enunciado "Con PBS" hace referencia a las impresiones que se dejaron en hinchamiento con PBS. Los datos fueron reportados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía como el promedio \pm error estándar para $n = 3$. Las

diferencias estadísticas están representadas por: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

Para la tinta con AH se logró realizar únicamente las pruebas de compresión sin hinchamiento, ya que las muestras de la tinta con AH que fueron sumergidas en PBS tenían una consistencia cremosa, por lo que al manipularlas perdían toda su estructura haciendo imposible posicionarlas en el Banco de Carga, ver figura 52.

Figura 52.

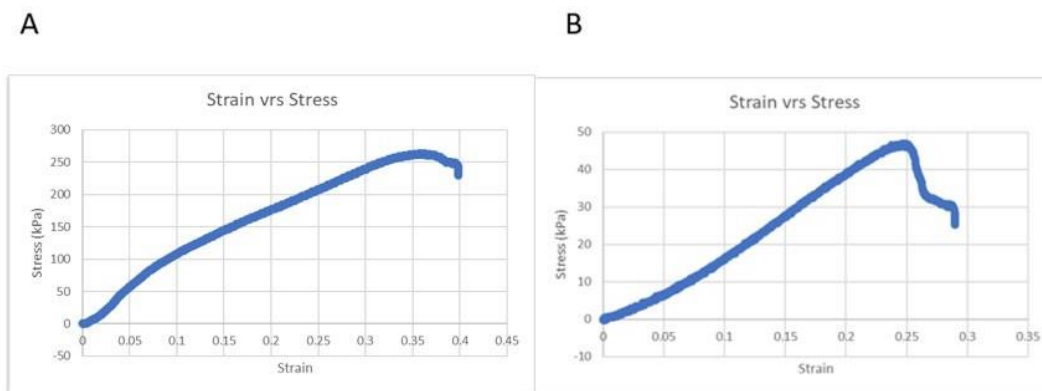
Impresiones con la TS en PBS por 24 h.



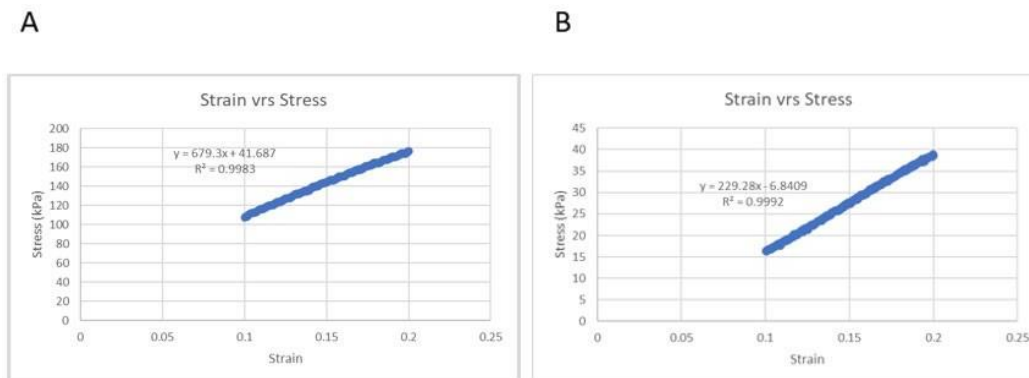
La TS presentó un módulo Young mucho menor (1.3667 kPa – 2.7136 kPa) al encontrado en la TC. Al igual que para las pruebas de compresión, las pruebas de tensión tuvieron módulos de Young como se muestra en la figura 53 y figura 54.

Figura 53.

Curva de stress/strain obtenidas en las pruebas de tensión para tinta control sin hinchamiento y con hinchamiento respectivamente.

**Figura 54.**

Curva de tensión seccionada entre 0.1 – 0.2 strain. A: Gráfica para TC sin hinchamiento. B: Gráfica para TC con hinchamiento.



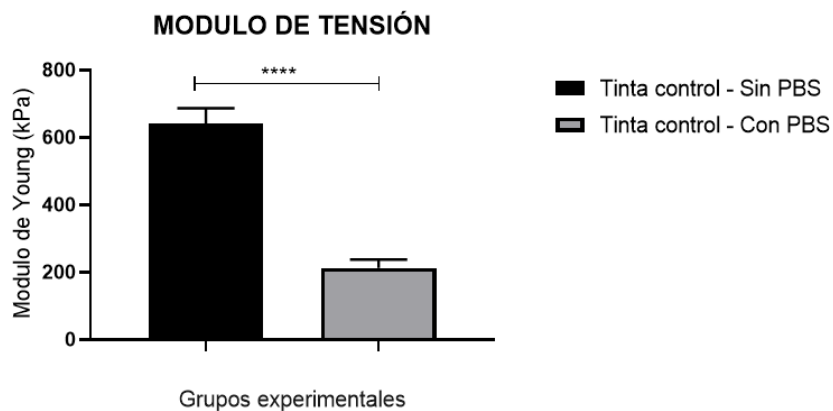
Estas mismas curvas e intervalos de recta (0.1 – 0.2) se utilizaron para las cuatro muestras de tinta control, tinta AH, con hinchamiento y sin hinchamiento. Los datos hallados en cada gráfica se encuentran en la Figura 55. La TC sin hinchamiento presentó en tensión un

módulo de Young mucho mayor (577.35kPa – 679.3kPa) al encontrado en la TC con hinchamiento (174.44kPa – 229.28kPa).

Teniendo en cuenta las longitudes iniciales y finales de cada muestra, se pudo hallar la ductilidad en las diferentes condiciones. La tinta control sin hinchamiento presenta una ductilidad de 3,39%, mucho mayor a la hallada en la tinta control con hinchamiento, 0,96%. La resistencia a la tracción que presentó la tinta de biomaterial en la prueba de tensión se encontró entre 35kPa – 48kPa.

Figura 55.

Módulos de Young tensión de las diferentes muestras de TC y tinta AH.

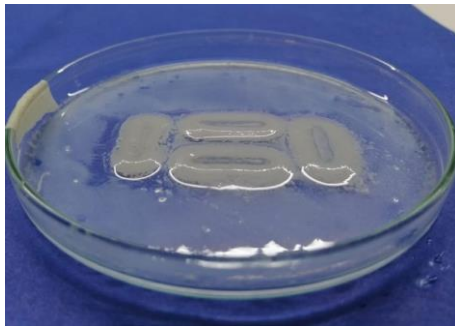


Nota. La leyenda que posee "Sin PBS" hace referencia a las impresiones que no se dejaron en hinchamiento con PBS. De igual forma el enunciado "Con PBS" hace referencia a las impresiones que se dejaron en hinchamiento con PBS. Los datos fueron reportados mediante un análisis t-student como el promedio \pm error estándar para $n = 3$. Las diferencias estadísticas están representadas por: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$, **** para $p < 0.0001$.

Al igual que en las pruebas de compresión, las pruebas de tensión realizadas en las impresiones que habían estado en hinchamiento presentaron mayor módulo de Young. En este caso no se pudo realizar las pruebas de tensión en la tinta de AH debido a que la estructura impresa fue degradada en ambos escenarios, sin hinchamiento y con hinchamiento por un día, ver figura 56; lo cual impidió tomar las muestras para posicionarlas en el banco de carga debido a que se rompían con el simple hecho de tratar de sacarlas del recipiente en donde se encontraban.

Figura 56.

Impresiones con la TS para ensayos de tensión después de un día en hinchamiento.



6. Análisis de resultados

Prueba de extrusión de filamento

A partir de los resultados obtenidos en esta prueba, se puede analizar que a medida que aumenta la concentración de Alg, aumenta la viscosidad de la tinta, que incide a su vez en sobregelaciones o la generación de grumos que impidan realizar una correcta impresión. Por otra parte si disminuimos la concentración de Alg a un valor inferior a 6.5%, se tiene una composición de tinta sin la viscosidad o densidad necesaria para la producción de un filamento, lo que se traduce en estados subgelados de la tinta, como es el caso de la tinta de 5.5% de Alg.

Al momento de adicionar el AH a la tinta control para las concentraciones de 1% y 3% se obtiene un filamento, pero se pasa de tener un filamento correctamente gelado (el cual es un filamento sin irregularidades a lo largo de este, uniforme en su composición y el cual no se entrecorte al momento de realizar una impresión, como lo es el filamento obtenido con la tinta control de 6.5% de Alg,) a tener filamentos o sub o sobre gelados que no permiten la formación de un filamento de mayor longitud o continuidad con las concentraciones de 1% y 3% de AH. La concentración de 5% de AH obtiene filamentos con mejores características que los de 1% y 3% de AH e incluso mejores que los de la tinta control, ya que se forman filamentos de mayor longitud y uniformidad, esto se da a causa de la concentración de AH que al igual que con el Alg, a medida que aumenta la concentración de AH aumenta la viscosidad de la tinta. Al tener bajas concentraciones de AH, como las de 1% y 3% en conjunto con una alta concentración de Alg de 6.5%, no se obtiene una composición uniforme de la tinta, lo que indica que la concentración de alginato brinda una alta viscosidad, pero esta es restada por la concentración de AH que es absorbida por el PPP, característica que incide en una alta variabilidad en los resultados. Esto se soluciona al tener concentraciones cercanas para ambos componentes

generando una estabilidad al entrar en contacto con el PPP, es decir que ambas concentraciones tienden a generar medios más viscosos.

Prueba de fusión de filamento

En esta prueba se obtuvo una fusión de filamentos en la concentración de 5.5% de alginato, ya que al tener un estado subgelado no permite la sobreposición de filamentos debido a la liquidez que presentan. Un estado sobregelado permite la sobreposición de filamentos, pero de menor longitud y poca uniformidad como en el caso de la tinta control de 7.5%. Por otro lado, la tinta control de 6.5% obtuvo un estado de gelación óptimo que permitió imprimir filamentos de mayor longitud sin fusionarse, demostrando que poseía la concentración adecuada de alginato para imprimir estructuras de mayor complejidad.

Prueba de extrusión de filamento

Las tintas de biomaterial con concentraciones de 1% y 3% de AH, lograron ser extruidas pero no presentaron las mejores características en su filamento (poca longitud e irregularidad en el diámetro del filamento) ni una gelación adecuada; es por eso por lo que la tinta de 5% de AH sobresalió por encima de las demás, ya que obtiene la mejor relación entre sobreposición y morfología de filamento, la cual se crea a partir de una viscosidad adecuada debido al aumento de la concentración de AH, resultados similares a los encontrados en la investigación. de Park et al (2021)..

Obtención de los parámetros de impresión que permitan tener un filamento imprimible.

Los parámetros de impresión tienen un rol vital., Los parámetros definidos en la presente tesis se evaluaron en función a los componentes Alg, AH y PPP, ya que los parámetros varían en función a la reología de la tinta; por ejemplo: si se desea imprimir con materiales de alta viscosidad como la TS que posee una mayor densidad que la TC, , se debe aumentar el valor de parámetros como fill density y LBP, ya que son parámetros con los que se aumenta o disminuye la presión ejercida en el embolo llegando a facilitar el flujo de la tinta. Es importante no seleccionar parámetros que se contradigan en cuanto a sus funciones, es decir, si se administra un LBP y fill density alto, no hay que poner una velocidad de impresión lenta ya que la salida del filamento va a ser rápida, pero al tener un movimiento lento la estructura presentará exceso de tinta (con TC y la TS). Para disminuir este exceso de tinta y obtener una mayor fidelidad de impresión también se disminuyó la densidad de impresión de 45% (densidad seleccionada en la tesis de Eraso, N., & Gómez, J. (2021)) a 30%, y se aumentó la distancia distancia de retracción de 0.5 mm a 0.7 mm. La TC realizada en esta tesis necesitó de un LBP de 0.25mm, mucho menor (LBP de 0.8mm) al utilizado en la tesis de Eraso, N., & Gómez, J. (2021), lo cual permitió alcanzar una mayor y más rápida estabilidad en el flujo de la tinta en el transcurso del tiempo.

Al disminuir la temperatura del dispensador de la bioimpresora se observó mejoría en la gelación y en la calidad de la impresión; esta mejoría fue del 4% en cuanto a porcentaje de error de impresión, una diferencia no significativa. La cama de la bioimpresora usada en el presente proyecto no permitía la variación de la temperatura, por lo cual no promovió la correcta gelación del filamento ya que tiende a fundirlo al momento en que la tinta pasa de estar a 4 °C en el dispensador a 20°C en la cama de la impresora. Para un mejor análisis de la incidencia de las

temperaturas de extrusión en la impresión es necesario que la temperatura del cabezal de extrusión y la cama de la bioimpresora sean las mismas.

Concentración de alginato.

Los resultados obtenidos mostraron que: la TC al 5.5% se encontraba en estado subgelado, la TC al 7.5% se encontraba en estado sobregelado y la TC al 6.5% mostraba un estado adecuado de gelación. Se observa que el estado de gelación de la tinta se ve afectado de manera directa por la concentración de alginato, pasando por un estado subgelado, gelado correctamente y sobregelado, a medida que aumenta la concentración de alginato en la tinta. Al presentar la TC al 6.5% un estado de gelación óptimo, los filamentos tuvieron una mayor longitud y uniformidad (sin gotas o segmentos cortados como era el caso de la tinta en estado subgelado y sobregelado respectivamente).

Tinta con Ácido Hialurónico.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con anterioridad en la TC y la propiedad del AH de ser soluble en agua (en este caso en PPP) para crear soluciones viscosas, se evidencia que al agregar este nuevo componente aumenta la densidad, el volumen y la viscosidad de la tinta, lo cual permite aumentar la longitud de los filamentos, pero también pasar a estado sobregelado con mayor facilidad. Las tintas con 1% y 3% de AH no presentaron un correcto estado de gelación, sus filamentos fueron de longitud corta y poca uniformidad, pero al aumentar la concentración de AH a 5%, se consiguió obtener un filamento con mejores características.

Se observa un aumento considerable en la viscosidad de la tinta de biomaterial a medida que se incrementa la concentración de AH, por lo cual es necesario aumentar la velocidad de agitación de la preparación de la tinta para lograr la mezcla correcta de los componentes.

También es necesario remover las porciones de tinta que se adhieren al aspa al mezclar y depositarlas nuevamente en el tubo de falcon o se obtendrá una tinta de material con grumos secos de AH que disminuirá la fidelidad de impresión o pueden llegar a obstruir la punta de la jeringa impidiendo realizar las impresiones.

Post-reticulación de la Tinta control y Tinta con AH

La solución reticulante usada de 550mM, mostró una reticulación rápida en las impresiones con TC, observando los cambios en los poros de la rejilla a minutos de haber dispuesto el reticulante en la impresión. Los cambios se mantuvieron al paso de las horas además de facilitar la manipulación de las impresiones fuera de la solución reticulante. De manera similar con la TS se observa una reticulación estable al alcanzar una hora de reticulación, con la diferencia de que se observan deformaciones o degradaciones de fragmentos de la impresión. Esto se debe a que el alginato se reticula de manera correcta pero no retiene a todo el componente de AH presente en la impresión, dando como resultado una reticulación por incompleta.

Prueba de colapso.

Inicialmente no era posible la impresión de estructuras mayores a 6 capas, los resultados mostraban que faltaba presión sobre el émbolo; ya que a medida que aumentaba el número de capas incrementaba la formación de cúmulos de tinta que impedían realizar la impresión. Para dar solución a esto se buscó incrementar el flujo de la impresión aumentando el diámetro del filamento, en donde según las especificaciones técnicas de la bioimpresora InVivo 3D2, al disminuir este parámetro se incrementa el flujo de impresión. También se aumentó el orificio de

salida de la jeringa de impresión removiendo la punta de teflón, mostrando que a pesar de tener una buena fidelidad de impresión en estructuras que poseen una sola capa, no se garantiza este mismo resultado a la hora de realizar impresiones con varias capas. Es muy importante tener en cuenta que al tener una mayor viscosidad se va a requerir de un aumento de la presión ejercida sobre el émbolo en el módulo de extrusión, pero si no se brinda un área de salida que permita liberar la energía acumulada de manera constante se crearán fluctuaciones en el flujo de salida de la tinta de biomaterial.

Prueba de degradación

Las rejillas seleccionadas para estas pruebas no presentaron el volumen suficiente de PPP para lograr leer la concentración de proteínas de las muestras con el NanoDrop; por lo cual se cambió el CAD de prueba (aumentando su volumen) y el recipiente de degradación (utilizando recipientes con menor volumen) para aumentar la concentración de proteínas en la muestra. Al tener un recipiente más pequeño ya no fue necesario agregar los 6ml de PBS para cubrir la totalidad de la estructura, sino 3ml de esta sustancia.

Las mediciones tomadas arrojaron que efectivamente existe una liberación de proteínas las cuales pueden pertenecer al alginato o ácido hialurónico. Dentro de las primeras horas se observa una liberación inicial (<10 mg/ml hasta las 48 horas), provocando el cambio de color de la muestra y el aumento de solutos al transcurrir el tiempo; lo que correspondería a cadenas de Alg que no fueron reticuladas sino encapsuladas y que debido al hinchamiento de la estructura son liberadas. Con el paso de los días y la degradación de la estructura la muestra toma un aspecto gelatinoso (debido a la reticulación del Alg liberado) y se empiezan a aumentar drásticamente los niveles de proteínas en el PBS (20mg/ml – 30mg/ml), lo que puede suponer también la liberación de AH y proteínas del PPP en las muestras.

Pruebas mecánicas

Se evidenció un cambio significativo (tanto para la prueba de compresión como para la de tensión) en el módulo de Young de las estructuras en la TC y TS cuando se dejaron en hinchamiento y cuando no. El módulo de Young en compresión pasó de 268.78 kPa sin hinchamiento a 33.864 kPa con hinchamiento, reducción similar al encontrado en las gráficas de tensión (663.94kPa – 174.44kPa). Este comportamiento se debe a que en el transcurso de las 24h de estar inmersa la estructura en PBS, se inicia el proceso de degradación, lo que conlleva a que el material sea más débil ante fuerzas de tensión y compresión. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas mecánicas, se puede observar que el módulo de Young en tensión es mucho mayor que el módulo de Young hallado en compresión, lo cual indica que la tinta presenta más resistencia a ser elongada que al comprimirse. Se observó que las propiedades del material cambiaban significativamente dependiendo del tamaño de la impresión, indicando que para estructuras de mayor tamaño es necesario aumentar el tiempo de reticulación con la intención de enlazar completamente el alginato que se encuentra inmerso en ella. Se requieren de más pruebas mecánicas en diferentes tiempos de degradación para establecer una relación entre la degradación de la estructura y sus propiedades mecánicas.

7. Conclusiones y Recomendaciones

El desarrollo del proyecto obtuvo como resultado una tinta de biomaterial con la capacidad de tener una correcta fidelidad de impresión como es la TS. El AH presente en esta tinta permitió aumentar la fidelidad de impresión cuando se realizó el análisis cuantitativo con una capa de impresión, por lo que se puede concluir que el AH aumenta la fidelidad de impresión de la tinta sin la necesidad de modificar parámetros de impresión. El AH de la TS aumentó la retención de agua dentro de la estructura impresa reduciendo las propiedades mecánicas de la tinta de biomaterial, así como la cantidad de líquido que se evidenciaba en la estructura después de ser impresa. Esto generó una rápida degradación de la tinta, generando su total degradación después de 48 h. Cabe resaltar que la TS fue sumergida completamente en PBS, por lo que la abrasión del medio en el que estaba en la estructura es mayor a comparación de los exudados que presenta una úlcera. Se recomendaría realizar la prueba de degradación buscando una forma de simular de forma más precisa la liberación de exudados de una úlcera crónica.

Las ecuaciones usadas para cuantificar la fidelidad de impresión cumplieron con el objetivo de determinar los valores de los parámetros evaluados, sin embargo, hay una deficiencia en la impresión de estructuras con varias capas, en donde puede existir una gran variabilidad en la fidelidad de impresión. Se recomienda que adicionalmente al proceso de determinar la fidelidad de impresión en una capa, se evalúe la impresión en varias capas de la estructura como un parámetro determinante en escoger la tinta de biomaterial.

De las pruebas realizadas la prueba de fusión y extrusión de filamento pudieron de manera acertada descartar concentraciones que posiblemente no funcionarían para impresión 3D por extrusión, esto se corroboró con la evaluación de la fidelidad de impresión, en donde ambas pruebas dieron como resultado la tinta de biomaterial escogida como la TS. Por este motivo, se

debe tener en cuenta las pruebas de fusión y extrusión de filamento como un método rápido para descartar tintas de biomaterial para bioimpresión 3D por extrusión.

Respecto a las pruebas de reticulación se logró una correcta reticulación de las rejillas impresas en una hora, sin embargo, al momento de reticular impresiones de mayor tamaño, como en el caso de las impresiones de las pruebas mecánicas, se evidenció que existían solutos en la solución los cuales pueden corresponder a Alg, que no fue reticulado correctamente debido a que el reticulante no penetró totalmente la estructura, o a AH el cual no fue debidamente encapsulado por la tinta de biomaterial preparada. Por este motivo se recomendaría dejar en reticulación por más tiempo las estructuras que contengan un gran tamaño o crear poros por donde pueda permear el reticulante.

En general, se desarrolló una tinta de biomaterial con Alg, AH y PPP a la cual se le cuantificó la fidelidad de impresión utilizando parámetros previamente encontrados con la TC planteada, adicionalmente se le realizaron pruebas mecánicas, de degradación y de colapso. Estas pruebas como conjunto indican que la TS presenta la capacidad de una alta retención de agua dentro de su estructura debido a la baja resistencia mecánica de la tinta de biomaterial, sin embargo, una alta fidelidad de impresión junto con una altura de impresión de aproximadamente un centímetro permitiría la aplicación de la TS en úlceras que presenten esta profundidad. De igual forma, se evidenció una degradación total de la estructura pasada dos días, teniendo en cuenta que la prueba de degradación fue realizada con la estructura totalmente sumergida, por lo que su microambiente no sería igual al de los líquidos exudados por una úlcera crónica.

Podemos afirmar que el alginato aporta el componente estructural a las impresiones debido a que en la prueba de colapso la TC fue la que más capas soporto sin llegar a colapsar, adicional a esto en la medición del módulo de Young en compresión y tensión se evidenció un

decrecimiento al momento de evaluarlo después del hinchamiento en PBS, en donde se libera proteínas presentes en la estructura impresa como es el caso del Alginato, por lo que al perder este polímero se genera una pérdida en las propiedades mecánicas de la TC evidenciado en el decrecimiento de los módulos de compresión y tensión; todo lo contrario, a lo que aporta el AH, ya que este redujo la resistencia mecánica del material, llegando al caso de imposibilitar las pruebas mecánicas de tensión. Por otro lado, el AH presentó una mejoría en la fidelidad de impresión respecto a la TC.

Para concluir la TS permitiría imprimir con una alta fidelidad de impresión estructuras de hasta 1 centímetro de altura, las cuales podrían ser usadas como un posible tratamiento de úlceras crónicas de pie diabético debido a que gracias a la retención de líquidos que presenta la estructura al momento de ser impresa, permitiría tener la úlcera humectada. Aunque no se realizaron pruebas citotóxicas, de proliferación y migración celular, los biomateriales utilizados en la tinta de biomaterial podrían promover la cicatrización del tejido de la úlcera crónica, sin embargo, esto debe ser corroborado mediante ensayos celulares con las estructuras impresas con la TS.

Al iniciar con el desarrollo del proyecto, se encontró variabilidad en los datos e impresiones realizadas a causa de usar muestras de PPP provenientes de distintos pacientes, de los que se desconocía su estado de salud y componentes presentes en las muestras que pudieran influir de manera negativa o positiva a la composición de la tinta, por lo que fue necesario realizar un pool de muestras de PPP que permitió tener una materia prima de trabajo estandarizada. Por otra parte, es importante verificar a la hora de la preparación de las tintas de biomateriales que sus componentes sólidos se depositen directamente en el solvente y no en los

alrededores de su contenedor, el cual fue un tubo Falcon de 45 ml; ya que en algunos casos al quedar restos de material adheridos al tubo que no son compactados o fusionados de manera correcta en la tinta, van a incidir en la formación de grumos que a su vez dificultarán la impresión e incluso podrían causar una toma errónea de decisiones basada en una mala preparación de la tinta de biomaterial.

En la bioimpresora InVivo 3D2 usada encontramos un parámetro denominado %Input Flow, el cual, según el manual de la bioimpresora, afecta de manera directa a todos los parámetros de impresión, pero se desconoce qué efectos o modificaciones realiza en ellos, es por esto por lo que se decidió dejar este parámetro con un valor de 100% con el fin de no generar cambios indeterminados en la impresión. Para generar cambios controlados se variaron los parámetros cuya función en la impresión era conocida, con el fin de entregar un resultado con fundamento sólido y replicable.

El desarrollo de la investigación dejó aspectos a mejorar como lo es el caso del agitador vertical, ya que al momento de agregar AH a la tinta se tornó una mezcla más densa que dificultó incorporar sus componentes debido a que tiende a adherirse al aspa sin entrar en contacto con los demás constituyentes de la tinta de biomaterial, por lo que de manera manual se debía remover estos fragmentos de ácido hialurónico con la espátula y redirigirlos al fondo del tubo falcon para que se mezclaran con el resto de la tinta. Es por esto, por lo cual se propone para futuras investigaciones, que el agitador además de realizar movimientos giratorios verticales también permita realizar oscilaciones o movimientos vibratoriales que faciliten la preparación de este tipo de tintas de biomaterial. Como recomendación a futuras investigaciones, se plantea el avanzar con pruebas de citotoxicidad, pruebas de viabilidad celular, así como la búsqueda de mejoras en los procesos de esterilidad, con el fin de reducir al máximo la desnaturalización de

proteínas. De igual forma, aunque la tinta de biomaterial planteada fue diseñada y direccionada en base al modelo de úlceras crónicas de pie diabético, la tinta de biomaterial no fue probada en un entorno que simule la anteriormente mencionada patología, por lo que se recomendaría testear la tinta de biomaterial bajo estas condiciones fisiológicas. Cabe aclarar que la tinta de biomaterial cumple con características generales que sugerirían su aplicación a otros tipos de úlceras en tejidos blandos siempre y cuando se evalúe mediante modelos que simulen la patología a tratar.

8. Referencias

Abatangelo, G., Vindigni, V., Avruscio, G., Pandis, L., & Brun, P. (2020). Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells*, 9(7), 1743. doi: 10.3390/cells9071743.

Antich, C., de Vicente, J., Jiménez, G., Chocarro, C., Carrillo, E., Montañez, E., Gálvez-Martín, P., & Marchal, J. A. (2020). Bio-inspired hydrogel composed of hyaluronic acid and alginate as a potential bioink for 3D bioprinting of articular cartilage engineering constructs. *Acta biomaterialia*, 106, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.046>.

Benwood, C., Chrenek, J., Kirsch, R., Masri, N., Richards, H., Teetzen, K., & Willerth, S. (2021). Natural Biomaterials and Their Use as Bioinks for Printing Tissues. *Bioengineering*, 8(2), 27. doi: 10.3390/bioengineering8020027.

Bowers, S., & Franco, E. (2020). Chronic wounds: Evaluation and management. *American Family Physician*, 101(3), 159–166.

Broussard, K. C., & Powers, J. G. (2013). Wound dressings: selecting the most appropriate type. *American journal of clinical dermatology*, 14(6), 449–459. <https://doi.org/10.1007/s40257-013-0046-4>.

Chang, T., Yin, H., Yu, X., Wang, L., Fan, L., Xin, J. H., & Yu, H. (2022). 3D PCL/collagen nanofibrous medical dressing for one-time treatment of diabetic foot

ulcers. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 214, 112480.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112480>.

Chellini, F., Tani, A., Zecchi-Orlandini, S., & Sassoli, C. (2019). Influence of Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma on endogenous mechanisms of skeletal muscle repair/regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 683. doi: 10.3390/ijms20030683.

Choi, J. S., Choi, S. H., & Yoo, H. S. (2011). Coaxial electrospun nanofibers for treatment of diabetic ulcers with binary release of multiple growth factors. *Journal of Materials Chemistry*, 21(14), 5258. <https://doi.org/10.1039/c0jm03706k>.

Choi, J. S., Heang Oh, S., Kim, Y. M., & Lim, J. Y. (2020). Hyaluronic Acid/Alginate Hydrogel Containing Hepatocyte Growth Factor and Promotion of Vocal Fold Wound Healing. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 17(5), 651–658. <https://doi.org/10.1007/s13770-020-00280-6>.

Del Amo, C., Perez-Valle, A., Perez-Garrastachu, M., Jauregui, I., Andollo, N., Arluzea, J., Guerrero, P., de la Caba, K., & Andia, I. (2021). Plasma-Based Bioinks for Extrusion Bioprinting of Advanced Dressings. *Biomedicines*, 9(8), 1023. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081023>.

Del Core, M., Ahn, J., Lewis, R., Raspovic, K., Lalli, T., & Wukich, D. (2018). The Evaluation and Treatment of Diabetic Foot Ulcers and Diabetic Foot Infections. *Foot & Ankle Orthopaedics*, 3(3), 247301141878886. doi: 10.1177/2473011418788864.

Devereaux, J., Nurgali, K., Kiatos, D., Sakkal, S., & Apostolopoulos, V. (2018). Effects of platelet-rich plasma and platelet-poor plasma on human dermal fibroblasts. *Maturitas*, 117, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.09.001>.

Diario Oficial 45.009, 2022. Resolución 1164 del 2002. [online] Available at: [Accessed 26 April 2022].

Escobar, J., García, D., Zaldivar, D., & Amashta, I. (2003). Hidrogeles. principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana De Polimeros*, 3. Retrieved from <https://reviberpol.files.wordpress.com/2019/08/2002-escobar2.pdf>.

Galeano Blanco, M., 2021. Desarrollo metodológico de una tinta de biomaterial a base de PEGDA, dirigido al diseño de apósitos para úlceras crónicas de pie diabético. SIBU-sistema biblioteca Unab, [online] 1, pp.14-20. Available at: [Accessed 4 March 2022].

Gao, Q., Kim, B., & Gao, G. (2021). Advanced Strategies for 3D Bioprinting of Tissue and Organ Analogs Using Alginate Hydrogel Bioinks. *Marine Drugs*, 19(12), 708. doi: 10.3390/md19120708.

Gillispie, G., Prim, P., Copus, J., Fisher, J., Mikos, A., & Yoo, J. et al. (2020). Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication*, 12(2), 022003. doi: 10.1088/1758-5090/ab6f0d.

Graça, M., Miguel, S., Cabral, C., & Correia, I. (2020). Hyaluronic acid—Based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 241, 116364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116364>.

Growney, E. A., Linder, H. R., Garg, K., Bledsoe, J. G., & Sell, S. A. (2020). Bio-conjugation of platelet-rich plasma and alginate through carbodiimide chemistry for injectable hydrogel therapies. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 108(5), 1972–1984. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34538>.

Gungor-Ozkerim, P., Inci, I., Zhang, Y., Khademhosseini, A., & Dokmeci, M. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials Science*, 6(5), 915-946. doi: 10.1039/c7bm00765e.

Habib, A., Sathish, V., Mallik, S., & Khoda, B. (2018). 3D Printability of Alginate-Carboxymethyl Cellulose Hydrogel. *Materials*, 11(3), 454. doi:<https://doi.org/10.3390/ma11030454>.

Hussain, Z., Thu, H. E., Shuid, A. N., Katas, H., & Hussain, F. (2018). Recent Advances in Polymer-based Wound Dressings for the Treatment of Diabetic Foot Ulcer: An Overview of State-of-the-art. *Current drug targets*, 19(5), 527–550.

<https://doi.org/10.2174/1389450118666170704132523>.

Jakus, A. E., Rutz, A. L., & Shah, R. N. (2016). Advancing the field of 3D biomaterial printing. *Biomedical Materials*, 11(1), 014102. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/1/014102>

Jia, Y., Zhang, X., Yang, W., Lin, C., Tao, B., Deng, Z., Gao, P., Yang, Y., & Cai, K. (2022). A pH-responsive hyaluronic acid hydrogel for regulating the inflammation and remodeling of the ECM in diabetic wounds. *Journal of materials chemistry. B*, 10(15), 2875–2888. <https://doi.org/10.1039/d2tb00064d>.

Jiménez, S., Rubio, J. A., Álvarez, J., & Lázaro-Martínez, J. L. (2018). Analysis of recurrent ulcerations at a multidisciplinary diabetic Foot unit after implementation of a comprehensive Foot care program. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, 65(8), 438.e1-438.e10. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2018.03.012>.

Koehler, J., Brandl, F. P., & Goepferich, A. M. (2018). Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. *European Polymer Journal*, 100, 1-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.12.046>

Leberfinger, A., Dinda, S., Wu, Y., Koduru, S., Ozbolat, V., Ravnic, D., & Ozbolat, I. (2019). Bioprinting functional tissues. *Acta Biomaterialia*, 95, 32-49.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.009>.

Lechleitner, M., Abrahamian, H., Francesconi, C., Kofler, M., Sturm, W., & Köhler, G. (2019). Diabetische Neuropathie und diabetischer Fuß (Update 2019) [Diabetic neuropathy and diabetic foot syndrome (Update 2019)]. *Wiener klinische Wochenschrift*, 131(Suppl 1), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s00508-019-1487-4>.

Lee, S. J., Seok, J. M., Lee, J. H., Lee, J., Kim, W. D., & Park, S. A. (2021). Three-Dimensional Printable Hydrogel Using a Hyaluronic Acid/Sodium Alginate Bio-Ink. *Polymers*, 13(5), 794. <https://doi.org/10.3390/polym13050794>.

Lewis, F. C., Bryan, N., & Hunt, J. A. (2012). A feeder-free, human plasma-derived hydrogel for maintenance of a human embryonic stem cell phenotype in vitro. *Cell regeneration* (London, England), 1(1), 6. <https://doi.org/10.1186/2045-9769-1-6>.

Liu, P., Jin, K., Zong, Y., He, M., Lu, C., Li, H., Wang, Y., & Li, C. (2022). Ionic liquid functionalized injectable and conductive hyaluronic acid hydrogels for the efficient repair of diabetic wounds under electrical stimulation. *Biomaterials science*, 10(7), 1795–1802.

<https://doi.org/10.1039/d2bm00026a>.

Mallis, P., Michalopoulos, E., Sarri, E. F., Papadopoulou, E., Theodoropoulou, V., Katsimpoulas, M., & Stavropoulos-Giokas, C. (2022). Evaluation of the Regenerative Potential of Platelet-Lysate and Platelet-Poor Plasma Derived from the Cord Blood Units in Corneal Wound Healing Applications: An In Vitro Comparative Study on Corneal Epithelial Cells. *Current issues in molecular biology*, 44(10), 4415–4438. <https://doi.org/10.3390/cimb44100303>.

Miroshnychenko, O., Chalkley, R., Leib, R., Everts, P., & Dragoo, J. (2020). Proteomic analysis of platelet-rich and platelet-poor plasma. *Regenerative Therapy*, 15, 226-235. doi: 10.1016/j.reth.2020.09.004.

Mora, C. and Berbeo, M. (2010). Manual de Gestión Integral de Residuos. Red Nacional de Laboratorios-SRNL, [online] 1. Available at: [Accessed 27 April 2022]. 33. GOV.CO, 2014. Decreto 351. [online] Available at: [Accessed 19 April 2022].

Neinaa, Y., Hodeib, A., Morquos, M., & Elgarhy, L. (2020). Platelet-poor plasma gel vs platelet-rich plasma for infraorbital rejuvenation: A clinical and dermoscopic comparative study. *Dermatologic Therapy*, 33(6). <https://doi.org/10.1111/dth.14255>.

O'Connell, C., Ren, J., Pope, L., Zhang, Y., Mohandas, A., Blanchard, R., Duchi, S., & Onofrillo, C. (2022). Characterizing Bioinks for Extrusion Bioprinting: Printability and Rheology. *3D Bioprinting Principles and Protocols*, 111–133. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0520-2_18

O'Meara, S., Cullum, N., Majid, M., & Sheldon, T. (2001). Systematic reviews of Wound Care Management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration. *Health Technology Assessment*, 4(21). <https://doi.org/10.3310/hta4210>

Ouyang, L., Yao, R., Zhao, Y., & Sun, W. (2016). Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*, 8(3), 035020. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/035020>.

Pereira C., N., Suh, H. P., & Hong, J. P. (JP). (2018). Úlceras Del Pie Diabético: Importancia Del Manejo Multidisciplinario Y Salvataje Microquirúrgico De La Extremidad. *Revista Chilena de Cirugía*, 70(6), 535– 543. <https://doi.org/10.4067/s0718-40262018000600535>.

Pérez-Panero, A., Ruiz-Muñoz, M., Cuesta-Vargas, A., & González-Sánchez, M. (2019). Prevention, assessment, diagnosis and management of diabetic foot based on clinical practice guidelines. *Medicine*, 98(35), e16877. doi: 10.1097/md.00000000000016877.

Rastogi, P., & Kandasubramanian, B. (2019). Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. *Biofabrication*, 11(4), 042001. doi: 10.1088/1758-5090/ab331e.

Sapra, Amit & Vaqar, Sarosh & Bhandari, Priyanka. (2019). Diabetes Mellitus -PMID: 31855345.

Solarte David, V. A., Güiza-Argüello, V. R., Arango-Rodríguez, M. L., Sossa, C. L., & Becerra-Bayona, S. M. 22. Bernhardt, T., Semmler, M. L., Schäfer, M., Bekeschus, S., Emmert, S., & Boeckmann, L. (2019). Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–10.
<https://doi.org/10.1155/2019/3873928>.

Solarte David, V.A. *et al.* (2022) “Decellularized tissues for wound healing: Towards closing the gap between scaffold design and effective extracellular matrix remodeling,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. Available at:
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.821852>.

Wu, D., Yu, Y., Tan, J., Huang, L., Luo, B., Lu, L., & Zhou, C. (2018). 3D bioprinting of gellan gum and poly (ethylene glycol) diacrylate based hydrogels to produce human-scale constructs with high-fidelity. *Materials & Design*, 160, 486-495. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.09.040>.

Wu, L., Norman, G., Dumville, J., O'Meara, S., & Bell-Syer, S. (2015). Dressings for treating foot ulcers in people with diabetes: an overview of systematic reviews. *Cochrane Database Of Systematic Reviews*. doi: 10.1002/14651858.cd010471.pub2.

Zhai, P., Peng, X., Li, B., Liu, Y., Sun, H., & Li, X. (2020). The application of hyaluronic acid in bone regeneration. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 151, 1224-1239. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.169.

Zhang, H., Cheng, J., & Ao, Q. (2021). Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine. *Marine Drugs*, 19(5), 264. doi: 10.3390/md19050264

9. Anexos

Los anexos hacen parte de alternativas que se utilizaron para solventar problemas que se presentaron desarrollando las pruebas planteadas en el proyecto, pero que después fueron solucionadas con otros métodos como es el caso de la prueba de colapso y de tablas de datos que entorpecerían la redacción del documento por su cantidad de información, como en las tablas de la prueba de Degradación.

Prueba de colapso

La prueba de colapso inicialmente fallaba al llegar a una altura de 4 capas, por lo que la primera alternativa para cumplir con nuestro objetivo fue medir la altura de la impresión en diferentes puntos. Las tablas 1 a la 15 ejemplifican estas mediciones efectuadas. Cada valor de error se hizo respecto a la altura del CAD para tres y cinco capas, que es 0.99 mm y 1.65 mm respectivamente. Las tablas muestran el porcentaje de error como si fuera una vista superior de la impresión, siendo cada posición en la tabla una posición del modelo CAD usado en la prueba de Colapso.

Tabla 1.

Porcentaje de error prueba de colapso tres capas muestra uno-experimento uno.

<u>Medición altura tres capas (%)</u>		
43	38.4	29.3
59.6		55.6
49.5	50.5	34.3

Tabla 2.

Porcentaje de error prueba de colapso tres capas muestra dos-experimento uno

Medición altura tres capas (%)		
37.4	44.4	27.3
65.7		74.7
39.4	54.5	28.3

Tabla 3.

Porcentaje de error prueba de colapso tres capas muestra tres-experimento uno.

Medición altura tres capas (%)		
30.3	56.6	29.3
60.6		53.5
27.3	57.6	26.3

Tabla 4.

Porcentaje de error prueba de colapso tres capas muestra uno-experimento dos.

Medición altura tres capas (%)		
30.3	55.6	25.3
58.6		53.5
27.3	57.6	26.3

Tabla 5.

Porcentaje de error prueba de colapso tres capas muestra dos-experimento dos.

Medición altura tres capas (%)		
34.3	54.5	37.4
59.6		59.6
29.3	50.5	33.3

Tabla 6.

Porcentaje de error prueba de colapso tres capas muestra tres-experimento dos.

Medición altura tres capas (%)		
--------------------------------	--	--

32.3	43.4	33.3
44.4		50.5
25.3	39.4	28.3

Tabla 7.

Porcentaje de error prueba de colapso cinco capas muestra uno-experimento uno.

<u>Medición altura cinco capas (%)</u>		
27.3	54.5	36.4
56.4		50.3
40	51.5	33.9

Tabla 8.

Porcentaje de error prueba de colapso cinco capas muestra dos-experimento uno.

<u>Medición altura cinco capas (%)</u>		
40.6	66.7	40
77.6		65.5
33.3	72.1	33.9

Tabla 9.

Porcentaje de error prueba de colapso cinco capas muestra tres-experimento uno.

<u>Medición altura cinco capas (%)</u>		
38.2	64.2	50.9
52.7		53.3
38.2	53.9	47.9

Tabla 10.

Porcentaje de error prueba de colapso cinco capas muestra uno-experimento dos.

<u>Medición altura cinco capas (%)</u>		
--	--	--

39.4	64.3	36.4
70.1		57.6
26.7	46.7	40.1

Tabla 11.

Porcentaje de error prueba de colapso cinco capas muestra dos-experimento dos.

<u>Medición altura cinco capas (%)</u>		
40.0	64.9	40
75.6		63.0
30.1	57.0	26.0

Tabla 12.

Porcentaje de error prueba de colapso cinco capas muestra tres-experimento tres.

<u>Medición altura cinco capas (%)</u>		
39.5	64.2	38.1
73.9		66.7
36.6	56.9	26.2

Tabla 13.

Porcentaje de error prueba de colapso siete capas muestra uno.

<u>Medición altura siete capas (%)</u>		
82.7	78.4	81
85.7		92.2
87.9	90	90

Tabla 14.

Porcentaje de error prueba de colapso siete capas muestra dos.

<u>Medición altura cinco capas (%)</u>		
82.7	87.9	87
88.7		91
85.3	89.2	86.1

Tabla 15.

Porcentaje de error prueba de colapso siete capas muestra tres.

Medición altura cinco capas (%)		
85.7	91	79.7
95.2		92.6
91.8	88.3	87.4

Prueba de degradación

En el apartado de anexos de la prueba de degradación se plasmaron las tablas de los valores de absorbancia medida por el espectrofotómetro durante todas las horas del experimento.

Tabla 16.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para el experimento 1 a las dos horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.193	-0.130	1.190
	-0.176	-0.120	1.230
1	-0.048	-0.030	1.660
	-0.610	-0.410	1.060
2	0.079	0.050	0.640
	0.068	0.050	0.570
3	0.105	0.070	0.490
	0.086	0.060	0.690
4	0.051	0.030	0.340
	0.026	0.020	-0.270
5	0.099	0.070	0.790
	0.034	0.020	-0.190
6	0.091	0.060	0.810
	0.060	0.040	0.620
C+	0.187	0.130	0.660
	0.147	0.100	0.550

Tabla 17.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para el experimento 2 a las dos horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.004	0	12.85
	-0.185	-0.12	1.15
1	0.104	0.07	0.93
	0.068	0.05	0.71
2	0.033	0.02	0.09
	0.049	0.03	0.37
3	0.132	0.09	0.65
	0.206	0.14	0.81
4	0.111	0.07	0.7
	0.054	0.04	0.52
5	0.059	0.04	0.87
	0.061	0.04	0.63
6	0.059	0.04	0.65
	0.012	0.01	0.48
C+	0.132	0.09	0.51
	0.142	0.1	0.48

Tabla 18.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para el experimento 1 a las cinco horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	0.002	0.000	2.230
	-0.024	-0.020	2.300
1	0.046	0.030	0.000
	0.343	0.230	0.960
2	-0.005	0.000	9.530
	0.056	0.040	0.890
3	0.101	0.070	0.200
	0.134	0.090	0.870
4	0.014	0.010	-2.410
	0.115	0.080	0.920
5	-0.023	-0.020	2.710
	0.082	0.050	1.070
6	0.029	0.020	-0.840
	0.045	0.030	1.190
C+	0.182	0.120	0.630
	0.080	0.050	-0.110

Tabla 19.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para el experimento 2 a las cinco horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.019	-0.01	0.84
	0.003	0	0.14
1	-0.019	-0.01	1.71
	0.298	0.2	0.95
2	-0.06	-0.04	1.43
	0.332	0.22	0.97
3	0.104	0.07	0.5
	0.358	0.24	0.83
4	0.144	0.1	0.47
	0.849	0.57	0.98
5	0.202	0.14	1.000
	0.215	0.14	0.89
6	-0.021	-0.01	2.38
	0.234	0.16	0.91
C+	0.08	0.05	-0.09
	0.13	0.09	0.36

Tabla 20.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para el experimento 1 a las 24 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.176	-0.120	1.010
	-0.153	-0.100	1.080
1	0.125	0.080	0.540
	-0.006	0.000	10.740
2	0.221	0.150	0.780
	-0.402	-0.270	1.130
3	-0.111	-0.070	1.260
	0.062	0.040	0.620
4	0.038	0.030	0.600
	-0.005	0.000	4.390
5	-0.075	0,05	1.040
	-0.041	-0.030	1.070
6	0.014	0.010	-1.380
	-0.021	-0.010	1.180
C+	0.136	0.090	0.260
	0.078	0.050	-0.120

Tabla 21.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para el experimento 2 a las 24 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	0.078	0.05	0.82
	0.045	0.03	1.15
1	0.188	0.13	0.76
	0.212	0.14	0.78
2	0.108	0.07	0.86
	0.178	0.12	0.9
3	0.113	0.08	0.82
	0.053	0.04	0.53
4	0.134	0.09	0.79
	-0.074	-0.05	1.75
5	0.047	0.03	0.27
	0.05	0.03	0.21
6	0.094	0.06	0.56
	0.226	0.15	0.81
C+	0.113	0.08	0.63
	0.114	0.08	0.52

Tabla 22.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para el experimento 1 a las 28 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.671	-0.450	1.020
	-0.621	-0.420	1.040
1	-0.341	-0.230	1.130
	-0.413	-0.280	1.130
2	-0.208	-0.140	1.100
	-0.464	-0.310	1.090
3	-0.437	-0.290	1.030
	-0.447	-0.300	1.030
4	-0.253	-0.170	1.090
	-0.121	-0.080	0.920
5	-0.443	-0.3	1.040
	-0.490	-0.330	1.040
6	-0.546	-0.370	1.030
	-0.264	-0.180	0.960
C+	-0.435	-0.290	1.130
	-0.370	-0.250	1.110

Tabla 23.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para el experimento 2 a las 28 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	0.041	0.03	0.76
	0.048	0.03	0.99
1	0.346	0.23	0.89
	0.439	0.29	0.88
2	0.153	0.1	0.78
	0.142	0.1	0.79
3	0.068	0.05	0.57
	0.059	0.04	0.45
4	0.11	0.07	0.69
	0.118	0.08	0.61
5	0.139	0.09	0.7
	0.256	0.17	0.86
6	0.164	0.11	0.88
	1.046	0.7	1.04
C+	0.183	0.12	0.57
	0.174	0.12	0.48

Tabla 24.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para el experimento 1 a las 43 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.018	-0.010	1.600
	0.058	0.040	0.930
1	0.905	0.610	0.970
	0.198	0.130	0.660
2	0.104	0.070	0.630
	0.144	0.100	0.700
3	64.000	0.040	0.390
	0.490	0.330	0.990
4	0.353	0.240	0.920
	-0.599	-0.400	1.060
5	0.073	0.050	0.740
	0.800	0.050	1.020
6	0.113	0.080	0.900
	0.305	0.200	1.000
C+	0.119	0.080	0.510
	0.130	0.090	0.540

Tabla 25.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para la rejilla modificada en el experimento 1 a las 5 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	0.028	0.020	0.630
	0.001	0.000	-2.150
	-0.008	-0.010	1.460
1	0.494	0.330	0.870
	0.557	0.370	0.850
	0.580	0.390	0.830
2	0.570	0.380	0.720
	0.794	0.530	0.780
	0.709	0.470	0.760
3	0.631	0.420	0.730
	0.680	0.460	0.730
	0.700	0.470	0.740
4	2.043	1.370	0.900
	1.199	0.800	0.810
	0.955	0.640	0.750
5	0.727	0.490	0.780
	0.851	0.570	0.790
	0.708	0.470	0.740
6	0.774	0.520	0.750
	0.776	0.520	0.770
	0.864	0.580	0.720
C+	0.900	0.600	0.700
	0.858	0.580	0.690
	0.885	0.590	0.670

Tabla 26.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para la rejilla modificada en el experimento 2 a las 5 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.013	-0.01	-0.09
	-0.005	0.00	-1.8
	-0.033	-0.02	0.94
1	0.541	0.36	0.85
	0.539	0.36	0.86
	0.522	0.35	0.85
2	0.625	0.42	0.71
	0.792	0.53	0.8
	0.725	0.49	0.74
3	1.475	0.99	0.91
	0.784	0.53	0.74
	2.034	1.36	0.98
4	1.02	0.68	0.8
	0.766	0.51	0.72
	0.922	0.62	0.76
5	1.159	0.78	0.85
	1.035	0.69	0.84
	0.867	0.58	0.78
6	0.791	0.53	0.79
	1.003	0.67	0.83
	0.794	0.53	0.74
C+	0.819	0.55	0.65
	0.86	0.58	0.65
	0.9	0.60	0.67

Tabla 27.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para la rejilla modificada en el experimento 1 a las 20 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	0.084	0.060	0.870
	0.069	0.050	1.130
	0.130	0.090	1.140
1	0.436	0.290	0.760
	1.261	0.840	0.950
	0.437	0.290	0.740
2	1.898	1.270	0.890
	1.395	0.930	0.840
	1.124	0.750	0.760
3	1.251	0.840	0.800
	1.174	0.790	0.800
	1.972	1.320	0.900
4	3.652	2.450	0.950
	1.215	0.810	0.750
	1.406	0.940	0.790
5	1.604	1.070	0.840
	0.978	0.660	0.730
	1.741	1.170	0.870
6	1.157	0.780	0.750
	1.867	1.250	0.860
	1.731	1.160	0.870
C+	0.797	0.530	0.670
	0.847	0.570	0.660
	0.900	0.600	0.700

Tabla 28.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para la rejilla modificada en el experimento 2 a las 20 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.009	-0.01	-0.64
	-0.024	-0.02	0.8
	-0.022	-0.01	0.64
1	0.746	0.5	0.91
	1.884	1.26	0.92
	0.588	0.39	0.84
2	0.987	0.66	0.74
	1.177	0.79	0.82
	5.361	3.59	1.00
3	1.184	0.79	0.78
	1.345	0.9	0.86
	2.192	1.47	0.89
4	1.201	0.8	0.76
	1.361	0.91	0.8
	2.385	1.6	0.94
5	1.153	0.77	0.780
	2.111	1.41	0.93
	1.426	0.96	0.86
6	1.707	1.14	0.86
	2.175	1.46	0.89
	0.94	0.63	0.71
C+	0.916	0.61	0.66
	0.89	0.60	0.67
	0.886	0.59	0.68

Tabla 29.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para la rejilla modificada en el experimento 1 a las 32 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	0.061	0.040	0.960
	0.018	0.010	0.760
	0.076	0.050	1.060
1	0.762	0.510	0.900
	0.440	0.290	0.750
	0.677	0.450	0.850
2	1.562	1.050	0.840
	4.246	2.850	0.970
	1.244	0.830	0.800
3	2.559	1.710	0.930
	1.449	0.970	0.830
	1.763	1.180	0.930
4	1.029	0.690	0.750
	1.435	0.960	0.850
	2.517	1.690	0.930
5	1.686	1.13	0.890
	1.111	0.740	0.780
	0.876	0.590	0.700
6	1.521	1.020	0.840
	-0.803	-0.540	1.410
	2.550	1.710	0.990
C+	0.926	0.620	0.690
	0.929	0.620	0.690
	0.912	0.610	0.700

Tabla 30.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para la rejilla modificada en el experimento 2 a las 32 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.022	-0.01	1.01
	-0.012	-0.01	0.54
	-0.023	-0.02	0.63
1	1.404	0.94	0.98
	1.296	0.87	0.81
	-14.394	-9.64	0.68
2	1.032	0.69	0.77
	1.148	0.77	0.81
	1.107	0.74	0.73
3	2.05	1.37	0.89
	4.046	2.71	0.98
	1.514	1.01	0.83
4	0.927	0.62	0.73
	2.804	1.88	0.94
	1.957	1.31	0.92
5	1.055	0.71	0.76
	1.719	1.15	0.86
	1.082	0.72	0.71
6	1.038	0.7	0.76
	0.963	0.65	0.71
	0.995	0.67	0.72
C+	0.938	0.63	0.69
	0.928	0.62	0.68
	0.925	0.62	0.7

Tabla 31.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para la rejilla modificada en el experimento 1 a las 44 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
	0.000	0.000	-8.310
C-	0.038	0.030	0.940
	-0.028	-0.020	1.280
	1.715	1.150	0.990
1	0.703	0.470	0.880
	0.813	0.540	0.900
	1.370	0.920	0.770
2	1.830	1.230	0.960
	1.775	1.190	0.870
	2.423	1.620	0.920
3	3.215	2.150	0.990
	1.267	0.850	0.800
	1.678	1.120	0.830
4	1.938	1.300	0.870
	2.348	1.570	0.900
	1.572	1.050	0.840
5	0.933	0.630	0.720
	1.560	1.050	0.850
	1.357	0.910	0.800
6	1.701	1.140	0.880
	0.921	0.620	0.700
	0.888	0.600	0.680
C+	0.943	0.630	0.690
	0.854	0.570	0.660

Tabla 32.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para la rejilla modificada en el experimento 2 a las 44 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
	-0.04	-0.03	1.3
C-	0.012	0.01	-0.41
	0.017	0.01	0.48
	0.723	0.48	0.84
1	2.345	1.57	1.00
	0.696	0.47	0.84
	1.539	1.03	0.83
2	1.294	0.87	0.81
	1.606	1.08	0.83
	8.905	5.97	1.02
3	5.6	3.75	0.97
	1.753	1.17	0.87
	1.233	0.83	0.74
4	2.144	1.44	0.88
	2.592	1.74	0.92
	1.682	1.13	0.85
5	5.448	3.65	1.02
	1.437	0.96	0.84
	2.023	1.36	0.92
6	2.741	1.84	0.95
	1.722	1.15	0.87
	0.853	0.57	0.62
C+	0.96	0.64	0.69
	0.974	0.65	0.69

Tabla 33.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para la rejilla modificada en el experimento 1 a las 68 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.054	-0.040	1.520
	-0.035	-0.020	1.880
	-0.017	-0.010	3.120
1	0.847	0.570	0.880
	1.211	0.810	0.950
	0.504	0.340	0.780
2	1.140	0.760	0.750
	3.206	2.150	0.950
	6.263	4.200	0.980
3	1.784	1.200	0.880
	11.406	7.640	0.950
	5.792	3.880	0.990
4	1.126	0.750	0.710
	1.469	0.980	0.800
	2.560	1.710	0.880
5	3.649	2.440	0.970
	3.895	2.610	0.970
	1.125	0.750	0.760
6	9.277	6.220	1.000
	1.131	0.760	0.740
	2.444	1.640	0.950
C+	0.956	0.640	0.680
	0.959	0.640	0.680
	0.992	0.660	0.700

Tabla 34.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro para la rejilla modificada en el experimento 2 a las 68 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	0.057	0.04	0.85
	0.032	0.02	1.06
	0.059	0.04	1
1	1.564	1.05	0.98
	1.056	0.71	0.94
	0.831	0.56	0.91
2	1.508	1.01	0.83
	4.708	3.15	0.99
	1.603	1.07	0.83
3	5.544	3.71	0.98
	2.641	1.77	0.93
	2.201	1.47	0.91
4	1.829	1.23	0.86
	2.043	1.37	0.88
	5.075	0.4	1
5	1.509	1.01	0.84
	1.517	1.02	0.84
	3.25	2.18	0.97
6	2.078	1.39	0.89
	2.739	1.83	0.94
	1.784	1.2	0.87
C+	0.992	0.66	0.69
	0.981	0.66	0.7
	0.998	0.67	0.69

Tabla 35.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 1 a las 2 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
	0.006	0.000	-1.550
C-	-0.051	-0.030	1.210
	-0.024	-0.020	1.030
	2.209	1.480	0.900
1	2.182	1.460	0.890
	1.376	0.920	0.780
	2.854	1.910	0.940
2	3.429	2.300	0.940
	3.629	2.430	0.940
	2.195	1.470	0.880
3	2.657	1.780	0.900
	3.120	2.090	0.920
	2.454	1.640	0.920
4	2.115	1.420	0.900
	1.315	0.880	0.790
	2.783	1.860	0.930
5	1.504	1.010	0.840
	2.532	1.700	0.910
	2.399	1.610	0.900
6	3.014	2.020	0.940
	3.031	2.030	0.910

Tabla 36.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 2 a las 2 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
	0.036	0.02	1.13
C-	0.03	0.02	1.27
	0.014	0.01	0.88
	2.479	1.66	0.9
1	1.955	1.31	0.87
	2.086	1.4	0.88
	2.279	1.53	0.9
2	4.099	2.75	0.96
	2.527	1.69	0.92
	15.79	10.58	0.99
3	1.485	0.99	0.81
	2.861	1.92	0.94
	2.876	1.93	0.91
4	2.471	1.66	0.91
	3.201	2.14	0.92
	2.215	1.48	0.9
5	2.656	1.78	0.89
	3.164	2.12	0.93
	8.82	5.91	0.98
6	3.254	2.18	0.91
	3.825	2.56	0.93

Tabla 37.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 1 a las 14 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	0.044	0.030	1.250
	0.068	0.050	1.160
	0.061	0.040	0.980
1	6.714	4.500	0.870
	38.682	25.920	1.000
	5.025	3.370	0.830
2	10.689	7.160	0.940
	7.246	4.850	0.890
	5.725	3.840	0.840
3	3.416	2.290	0.730
	12.339	8.270	0.940
	5.132	3.560	0.840
4	57.663	38.630	1.000
	7.629	5.110	0.890
	19.145	12.830	0.950
5	3.852	2.580	0.760
	4.585	3.070	0.790
	4.528	3.030	0.780
6	5.513	3.690	0.840
	5.713	3.830	0.840
	8.506	5.700	0.900

Tabla 38.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 2 a las 14 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.026	-0.02	0.94
	-0.027	-0.02	1.23
	-0.043	-0.03	0.99
1	10.047	6.73	0.92
	3.787	2.54	0.74
	5.397	3.92	0.83
2	3.94	2.64	0.75
	4.293	2.88	0.8
	9.21	6.17	0.90
3	8.284	5.55	0.88
	4.636	3.11	0.8
	10.564	7.08	0.91
4	40.108	26.87	1
	23.922	16.03	0.98
	3.768	2.52	0.73
5	5.282	3.54	0.830
	34.565	23.16	1.06
	6.792	4.55	0.87
6	4.613	3.09	0.8
	7.511	5.03	0.88
	3.702	2.48	0.73

Tabla 39.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 1 a las 24 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.090	-0.010	1.540
	-0.022	-0.010	1.520
	-0.019	-0.010	1.810
1	4.288	2.870	0.730
	4.577	3.070	0.740
	4.453	2.980	0.740
2	8.596	5.760	0.870
	7.223	4.840	0.830
	5.059	3.390	0.770
3	9.316	6.240	0.880
	7.303	4.890	0.850
	7.242	4.850	0.830
4	9.851	6.600	0.890
	14.067	9.430	0.930
	16.879	11.310	0.950
5	4.460	2.99	0.730
	4.123	2.760	0.700
	4.417	2.960	0.730
6	4.226	2.830	0.720
	4.151	2.780	0.720
	4.502	3.020	0.750

Tabla 40.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 2 a las 24 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.032	.002	1.1
	-0.044	-0.03	1.09
	-0.031	-0.02	1.31
1	4.304	2.88	0.71
	4.169	2.79	0.71
	4.332	2.9	0.72
2	8.226	5.54	0.87
	4.88	3.27	0.76
	4.046	2.71	0.7
3	4.734	3.17	0.75
	4.79	3.21	0.73
	4.529	3.03	0.71
4	5.008	3.36	0.77
	4.498	3.01	0.73
	4.464	9.69	0.92
5	4.215	2.82	0.71
	4.325	2.9	0.7
	4.339	2.91	0.71
6	4.213	2.82	0.7
	4.193	2.81	0.77
	4.103	2.75	0.7

Tabla 41.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 1 a las 48 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.032	-0.020	1.660
	-0.031	-0.030	1.310
	0.055	0.030	1.250
1	8.090	5.420	0.800
	16.612	11.130	0.940
	7.044	4.720	0.750
2	9.702	6.500	0.820
	7.412	4.970	0.760
	12.157	8.150	0.860
3	7.419	4.970	0.740
	31.577	21.160	0.940
	13.263	8.890	0.850
4	7.321	4.910	0.760
	8.466	5.670	0.790
	25.314	16.960	0.860
5	18.271	12.240	0.910
	7.330	4.910	0.730
	13.264	8.890	0.860
6	6.416	4.300	0.710
	8.426	5.650	0.780
	7.392	4.950	0.760

Tabla 42.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 1 a las 110 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
C-	-0.003	0.000	-4.560
	0.006	0.000	1.660
	-0.017	-0.010	-0.030
1	51.818	34.720	1.020
	18.582	12.450	0.980
	19.016	12.740	0.990
2	36.892	24.720	0.980
	55.452	37.150	1.020
	24.141	16.170	0.970
3	26.034	17.440	0.920
	54.279	36.370	0.990
	46.409	31.090	1.010
4	43.438	29.100	0.990
	58.985	39.520	1.020
	47.847	32.060	1.020
5	32.782	21.960	0.960
	43.301	29.010	1.000
	17.807	11.930	0.950
6	50.165	33.610	1.010
	64.034	42.900	1.040
	28.480	19.080	1.020

Tabla 43.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 2 a las 110 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
	0.008	0.01	6.06
C-	0.019	0.01	2.67
	0	0	4.28
	18.527	12.41	0.99
1	38.994	26.13	1.04
	38.78	25.98	0.97
	54.739	36.68	1
2	21.889	14.67	0.98
	43.656	29.25	1
	30.88	20.69	0.95
3	44.233	29.64	1
	32.556	21.81	0.96
	29.517	19.78	1
4	20.011	13.41	0.94
	51.036	34.19	1.01
	55.774	37.37	1
5	22.393	15	1.03
	54.639	36.61	0.99
	63.515	42.56	1.03
6	33.867	22.69	1.04
	46.935	31.45	1

Tabla 43.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 1 a las 134 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
	-0,007	0,000	3,000
C-	0,174	0,120	1,000
	-0,029	-0,020	1,870
	39,628	26,550	1,090
1	28,760	19,270	1080.00
	39,150	26,230	1,060
	48,274	32,240	1,090
2	36,991	24,780	1,080
	48,931	32,780	1,050
	32,102	21,510	1,010
3	37,401	25,060	1,080
	53,038	35,540	1,080
	36,827	24,670	1,080
4	39,300	24,320	1,080
	38,957	26,100	1,070
	8,704	5,860	1,090
5	49,399	33,100	1,060
	51,773	34,690	1,060
	50,358	33,740	1,070
6	65,068	43,600	1,110
	57,241	38,350	1,100

Tabla 44.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 2 a las 134 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
	0,061	0,04	0,74
C-	0,004	0	-5,18
	-0,055	-0,04	1,63
	44,163	29,59	1,05
1	39,41	26,4	1,07
	48,179	32,28	1,11
	55,362	37,09	1,09
2	45,115	30,23	1,07
	33,264	22,29	1,04
	38,323	25,68	1,05
3	47,058	31,53	1,04
	37,921	25,41	1,06
	32,686	21,9	1,06
4	62,097	41,61	1,03
	39,189	26,26	1,05
	35,921	24,07	1,07
5	50,989	34,16	1,06
	32,521	21,79	1,07
	44,338	29,71	1,07
6	48,186	32,28	1,06
	53,124	35,59	1,05

Tabla 54.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 1 a las 158 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
	-0,099	-0,070	1,170
C-	-0,088	-0,060	1,310
	0,169	0,110	0,970
	23,011	15,420	1,060
1	41,033	27,490	1110,00
	41,397	27,740	1,100
	44,978	30,140	1,070
2	26,785	17,950	1,090
	38,290	25,650	1,080
	53,097	35,570	1,090
3	41,494	27,800	1,100
	46,593	31,220	1,070
	34,154	22,880	1,080
4	46,837	31,380	1,100
	35,201	23,580	1,090
	48,960	32,800	1,080
5	33,725	22,600	1,090
	34,271	22,960	1,110
	35,088	23,510	1,070
6	29,493	19,760	1,000
	73,096	48,970	1,080

Tabla 55.

Resultados proteicos dados por el espectrofotómetro cubo en el experimento 2 a las 158 horas de degradación.

#PLACA	mg/mL	A280	A260/280
	-0,022	-0,01	1,1
C-	0,912	0,61	1,09
	-0,033	-0,02	1,36
	42,871	28,72	1,08
1	33,403	22,38	1,11
	36,958	24,76	1,11
	37,168	24,9	1,1
2	49,402	33,1	1,06
	40,892	27,4	1,08
	44,294	29,68	1,11
3	50,801	34,04	1,08
	36,85	24,69	1,1
	48,567	32,54	1,1
4	59,575	39,92	1,04
	55,976	37,5	1,1
	47,633	31,91	1,1
5	44,732	29,97	1,1
	39,676	26,58	1,09
	53,463	35,82	1,11
6	44,603	29,88	1,09
	58,223	39,01	1,09