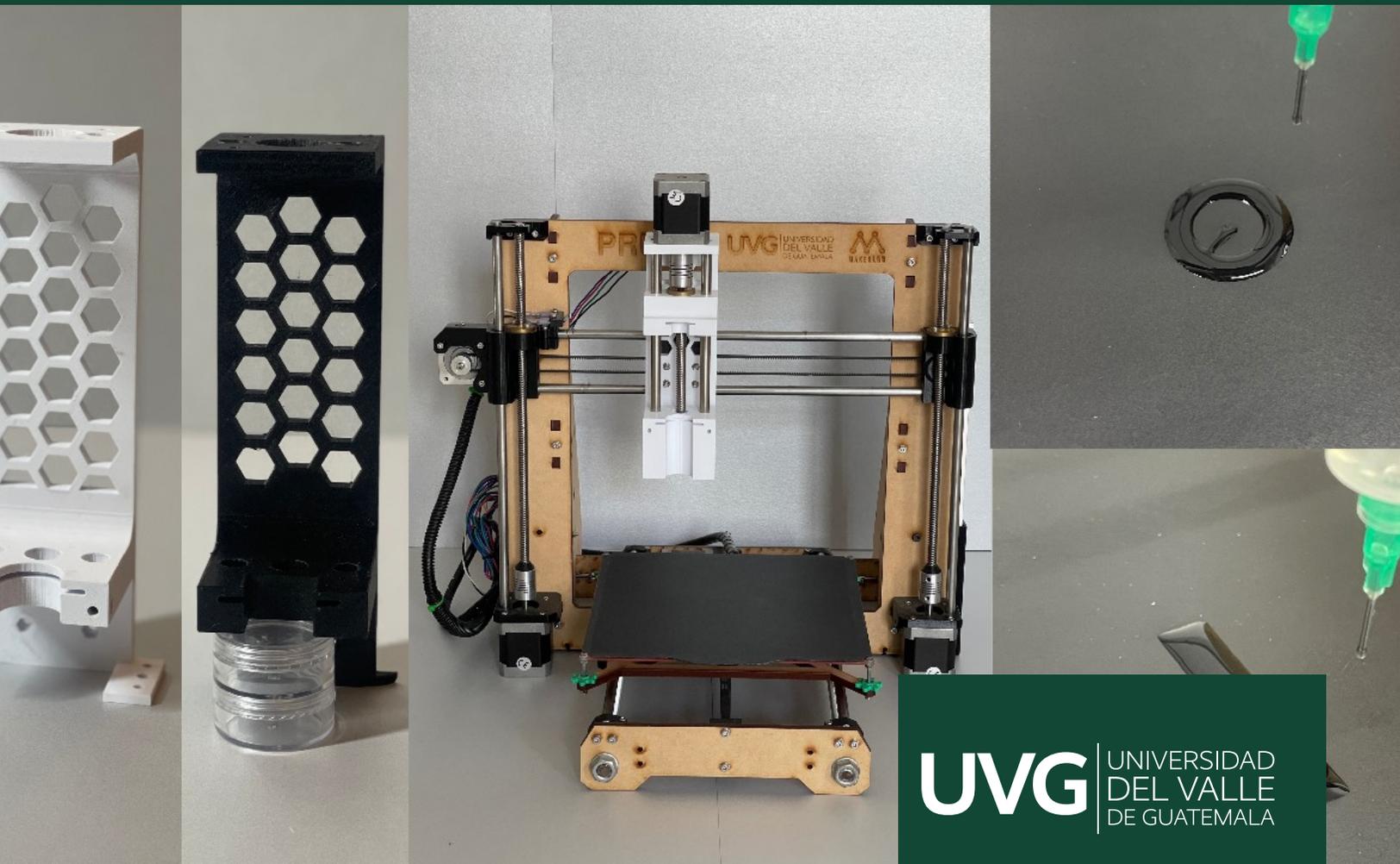

Diseño, desarrollo e implementación de un prototipo de bioimpresión 3D de bajo costo a partir de una impresora 3D convencional.

Diego Andrés Pozuelos Pac



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Diseño, desarrollo e implementación de un prototipo de bioimpresión 3D de bajo costo a partir de una impresora 3D convencional.

Trabajo de graduación presentado por Diego Andrés Pozuelos Pac para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Biomédica

Guatemala,

2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Diseño, desarrollo e implementación de un prototipo de bioimpresión 3D de bajo costo a partir de una impresora 3D convencional.

Trabajo de graduación presentado por Diego Andrés Pozuelos Pac para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Biomédica

Guatemala,

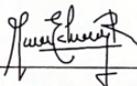
2024

Vo.Bo.:

(f) 
M. Sc. José Andrés Leal Ordóñez

Tribunal Examinador:

(f) 
M. Sc. José Andrés Leal Ordóñez

(f) 
Dra. Mónica Echeverry

(f) 
Ing. Kurt Kellner

Fecha de aprobación: Guatemala, 20 de enero de 2024

La elaboración de esta tesis demuestra el esfuerzo, dedicación y pasión que he invertido en el transcurso de mi licenciatura en Ingeniería Biomédica. La elección de este tema va más allá de mi interés personal, más bien va para que más personas se adentren al área de la Ingeniería Biomédica y puedan seguir con el proyecto de investigación que decidí iniciar. Con el título de “Diseño, desarrollo e implementación de un prototipo de bioimpresión 3D de bajo costo a partir de una impresora 3D convencional”. Donde combiné mis conocimientos de programación, ingeniería de tejidos y diseño mecánico, los cuales adquirí durante los 5 años de mi carrera universitaria.

Quiero expresar mis agradecimientos al Ing. Pablo Mazariegos y al departamento de Ingeniería Mecatrónica, Electrónica y Biomédica, cuya colaboración, apoyo y tiempo fue de gran ayuda para desarrollar este proyecto. A la Lic. Ana Luisa Mendizabal, por permitirme usar sus laboratorios y brindarme todo lo necesario. Mi agradecimiento también se extiende a mi asesor, el M.Sc. José Leal, por su conocimiento, dedicación y compromiso durante la realización de este proyecto. Agradezco a la Universidad del Valle de Guatemala por acogerme y permitirme ser parte de ella, por haberme formado como un futuro profesional y brindarme las herramientas necesarias para salir al campo laboral.

Agradezco a mis abuelos, por siempre orar por mí y su amor incondicional. Agradezco a Dios, por ser la luz de esperanza y alegría que guía mi vida, que me da fortaleza para seguir adelante y no rendirme ante las adversidades. A mis hermanos, por siempre apoyarme y motivarme a seguir adelante. Por último y en especial, quiero dedicar un sincero agradecimiento a mis padres, por haberme brindado una vida llena de oportunidades. Por su dedicación incansable para proporcionarme una educación, un hogar cálido y una vida llena de amor. Cada logro en mi camino se los dedico a ellos. Gracias por ser mi inspiración y por hacer posible mi búsqueda del conocimiento y crecimiento personal.

Prefacio	III
Lista de figuras	VIII
Lista de cuadros	IX
Resumen	X
Abstract	XI
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación	5
4. Objetivos	7
4.1. Objetivo general	7
4.2. Objetivos específicos	7
5. Alcance	8
6. Marco teórico	9
6.1. Ingeniería de tejidos	9
6.1.1. Scaffolds (andamios)	10
6.2. Impresión 3D	10
6.2.1. Estereolitografía (SLA)	11
6.2.2. Modelado por deposición fundida (FDM)	11
6.2.3. Sinterización selectiva por láser (SLS)	11
6.3. Bioimpresión 3D	12
6.3.1. Bioimpresión por extrusión	14
6.3.2. Bioimpresión por inyección de tinta	14
6.3.3. Bioimpresión por láser	14
6.4. Bioimpresoras comerciales	14

6.4.1. CELLINK	15
6.4.2. ALLEVI by 3D SYSTEMS	15
6.4.3. REGEMAT	16
6.5. Biomateriales	16
6.5.1. Hidrogel	17
6.5.2. Hidrogeles usados comúnmente en la bioimpresión 3D	18
6.6. Avances en la bioimpresión 3D utilizando Alginato de Sodio como biotinta	20
6.6.1. Tejido vascular	20
6.6.2. Fabricación de hueso	20
7. Metodología	21
7.1. Especificaciones de la impresora 3D	21
7.2. Modificación de software	22
7.2.1. Modificaciones de Firmware Marlin 2.1.1	22
7.2.2. Creación de G-code para el inicio y finalización de una impresión	23
7.2.3. Boquillas G18 y G20	24
7.2.4. Creación de perfiles en Cura Lulzbot	25
7.3. Modificación de hardware	26
7.3.1. Modificación de hardware de la impresora 3D	26
7.3.2. Calibración del sistema de extrusión por jeringa	28
7.4. Desarrollo y caracterización del hidrogel	29
7.4.1. Síntesis del hidrogel: Alginato de Sodio	29
7.4.2. Síntesis del Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	29
7.5. Parametrización de la bioimpresora 3D	30
7.5.1. Prueba de parametrización	30
7.5.2. Parametrización de impresión 3D	30
7.5.3. Prueba de impresión con boquilla G18 y G20	32
7.5.4. Prueba de impresión con Alginato de Sodio al 5% y 8%	33
8. Resultados	34
8.1. Software	34
8.2. Hardware	34
8.3. Calibración	37
8.4. Parametrización de la bioimpresora 3D	39
8.4.1. Prueba de parametrización	39
8.4.2. Parametrización de impresión 3D	40
8.4.3. Prueba de impresión con boquilla G18 y G20	42
8.4.4. Prueba de impresión con Alginato de Sodio al 5% y 8%	46
9. Discusión	48
10. Conclusiones	52
11. Recomendaciones	53
12. Bibliografía	54

13. Anexos	58
13.1. Dimensiones del sistema de extrusión final.	58
13.2. Creación de perfiles en Cura Lulzbot.	60

Lista de figuras

1.	Requerimientos para el diseño de tejido artificial [20].	10
2.	Procedimiento para impresión 3D [22].	11
3.	Representación esquemática de las técnicas de impresión 3D. a) Estereolitografía [23], b) FDM [24] y c) SLS [25].	12
4.	Proceso de la bioimpresión 3D [13].	13
5.	Representación esquemática de las técnicas de bioimpresión 3D. a) Por inyección de tinta, b) por extrusión y c) por láser [15].	14
6.	Bioimpresoras comerciales: a) BIO X [29], b) Allevi 1 [30] y c) Regemat Bio V1 [31].	16
7.	Estructura química de a) Agarosa, b) Ácido hialurónico [39] y c) Colágeno Tipo I [40].	19
8.	a) Estructura química del Alginato de Sodio [41] y b) Interacción entre el Alginato de Sodio y el Cloruro de Calcio (CaCl_2) [42].	19
9.	Impresora 3D antes de las modificaciones.	22
10.	Diferencia entre el inicio y final de una impresora 3D y una bioimpresora 3D.	24
11.	Boquillas para jeringas a) G18 y b) G20.	25
12.	Placa madre: Ramps 1.4 pinout [44].	27
13.	Sistema de extrusión modelado en Inventor.	28
14.	Integración de la balanza analítica con el sistema de extrusión.	29
15.	Diseños digitales para parametrización a) 3 líneas con separación de 4 mm entre cada uno, 0.9 mm de grosor y 50 mm de largo. B) onda senoidal 20 mm de alto, 77 mm de largo y 0.9 mm de grosor.	31
16.	Cuadrado digital para parametrización, 40 mm de alto por 40 mm de largo.	32
17.	a) Cuadrado digital para parametrización, 50 mm de alto por 50 mm de largo y b) Hexágono digital, 40 mm de vértice a vértice.	33
18.	Modelos diseñados para el sistema de extrusión.	36
19.	Sistemas implementados en la bioimpresora con el sistema de cojinetes en las dos versiones.	37
20.	Resultados de variabilidad en la extrusión de 7000 pasos por ml.	38
21.	Resultados de variabilidad en la extrusión de 1400 pasos por ml.	39

22. Parametrización del hidrogel y CaCl_2 a distintas concentraciones con diferentes boquillas.	40
23. Mediciones del grosor y distancia entre cada línea impresa. a) Alginato de Sodio al 2 %, b) 3 %, c) 5 % y d) 8 %.	41
24. Mediciones del grosor, largo y ancho del diseño en forma de onda senoidal con regla Bernier y el estereoscopio.	42
25. Interacción del alginato de sodio con el cloruro de calcio en una caja de petri.	43
26. Modificando parámetros de Infill a) 15 %, b) 50 %, c) 75 %, d) 100 % y de Top/Bottom Pattern a-d) Lineal y e-f) ZigZag.	44
27. Hidrogeles impresos con boquilla G18 luego de la reticulación de CaCl_2 a distintas concentraciones (450 mM, 900 mM y 1.35 M) y Alginato de Sodio a distintas concentraciones (2 % y 3 %).	45
28. Hidrogeles impresos con boquilla G20 luego de la reticulación de CaCl_2 a distintas concentraciones (450 mM, 900 mM y 1.35 M) y Alginato de Sodio a distintas concentraciones (2 % y 3 %).	46
29. Hidrogeles impresos con boquilla G18 luego de la reticulación de CaCl_2 a distintas concentraciones (450 mM, 900 mM y 1.35 M) y Alginato de Sodio a distintas concentraciones (5 % y 8 %).	47
30. a) Top/Bottom Pattern: Lineal y b) Top/Bottom Pattern: ZigZag.	50
31. Dimensiones del sistema de extrusión final.	58
32. Dimensiones del sistema de soporte de cojinetes final para tuerca trapezoidal.	59

Lista de cuadros

1. Cuadro comparativo de bioimpresoras 3D comerciales.	16
2. Modificaciones de código en Firmware Marlin 2.1.1.	23
3. Creación de G-code para la bioimpresora.	24
4. Especificaciones de las boquillas G18 y G20.	25
5. Print Setup: Recommended.	60
6. Print Setup: Quality.	60
7. Print Setup: Shell.	61
8. Print Setup: Infill.	62

La fabricación de órganos y tejidos artificiales utilizando bioimpresoras 3D empieza a tomar fuerza como una de las principales soluciones para combatir la escasez de órganos a nivel mundial. Esta tecnología permite desarrollar tejido cardíaco, dérmico, óseo, cartilaginoso, entre otros. Utilizando materiales biocompatibles estructurados en tres dimensiones de forma análoga al órgano o tejido que se desea reemplazar. Esta tecnología tiene un gran potencial, pero requiere de grandes inversiones en los dispositivos de impresión, lo que dificulta que países en vías de desarrollo puedan costear e implementar estos métodos.

El presente proyecto tiene como objetivo el diseño y desarrollo de una bioimpresora de bajo costo modificando una impresora 3D convencional con el fin de poder realizar impresiones tridimensionales a base de un hidrogel de alginato de sodio. Se realizaron modificaciones de hardware, diseñando un sistema de extrusión por jeringa que permite dispensar un hidrogel a base de alginato de sodio. Se utilizó el firmware Marlin 2.1.1, el cual se encarga de controlar las funciones de la impresora 3D, con el fin de modificar las líneas de código para imprimir a temperatura ambiente. Se utilizó Cura Lulzbot para modificar los parámetros de impresión para cada tipo de boquilla utilizados durante el proyecto, tales como G18 y G20.

Se desarrolló un hidrogel a base de alginato de sodio y se determinó el proceso óptimo de gelificación utilizando cloruro de calcio (CaCl_2) como reticulante. Adicionalmente, se verificó la influencia que tiene la concentración del hidrogel en el proceso de impresión y se identificó el diámetro de boquilla más adecuado para una impresión. Por lo que se realizaron pruebas a mano alzada, pruebas de impresión con cada tipo de boquilla, pruebas a distintas concentraciones del hidrogel así como del reticulante.

The manufacturing of artificial organs and tissues using 3D bioprinters is gaining momentum as one of the primary solutions to address the global organ shortage. This technology enables the development of cardiac, dermal, bone, cartilaginous, and other tissues. Using biocompatible materials structured in three dimensions, mimicking the organ or tissue to be replaced. This technology holds great potential but requires significant investments in printing devices, making it challenging for developing countries to afford and implement these methods.

The present project aims to design and develop a low-cost bioprinter by modifying a conventional 3D printer to enable three-dimensional printing using a sodium alginate hydrogel. Hardware modifications were made, including the design of a syringe-based extrusion system for dispensing sodium alginate hydrogel. The Marlin 2.1.1 firmware, responsible for controlling the functions of the 3D printer, was utilized to modify the code lines for printing at room temperature. Cura Lulzbot was used to adjust the printing parameters for each type of nozzle used during the project, such as G18 and G20.

A sodium alginate hydrogel was developed, and the optimal gelation process was determined using calcium chloride (CaCl_2) as a cross-linking agent. Additionally, the influence of hydrogel concentration on the printing process was verified, and the most suitable nozzle diameter for printing was identified. This involved conducting freehand tests, printing trials with each type of nozzle, and tests with varying hydrogel and cross-linking agent concentrations.

Las bioimpresoras 3D, revolucionaron el campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, permitiendo crear estructuras tridimensionales complejas a partir de materiales biocompatibles, proporcionando una solución a la escasez de donación de órganos a nivel mundial y a enfermedades degenerativas que no se puedan curar por el cuerpo. La bioimpresión 3D es una técnica que agrupa los principios de impresión 3D convencional con conocimientos de biología que consiste en la deposición precisa de material biocompatible, material que admite el tejido humano sin rechazarlo, para construir modelos anatómicos y de tejido que cumplan con alguna función, sustituyendo parcial o completamente el tejido humano, para ello el material biocompatible requiere de células y factores de crecimiento para ser implantado.

El objetivo de este proyecto es el diseño, desarrollo e implementación de un prototipo de bioimpresión 3D de bajo costo utilizando como base una impresora 3D convencional, así como el desarrollo de un hidrogel de alginato de sodio y el proceso óptimo para la gelificación del hidrogel utilizando como agente reticulante al cloruro de calcio (CaCl_2). Para ello, se llevaron a cabo dos modificaciones principales: Las modificaciones de hardware y software. En la parte de hardware, las modificaciones fueron desde el diseño de un sistema de extrusión por jeringa hasta modificaciones en la cama de impresión. Mientras que en las modificaciones de software, se desarrolló un código G-code que permita que la impresión inicie de tal manera que el punto de inicio sea dado por el usuario, mediante el movimiento de los ejes de la impresora y además de modificaciones importantes en el código de la impresora.

El motivo del desarrollo de un prototipo de una bioimpresora 3D tiene como finalidad abrir un nuevo campo de investigación en el país, apoyando a expandir el conocimiento en la rama de ingeniería de tejidos y la importancia de esta. Con el fin de generar una solución ante la problemática de la escasez de donación de órganos.

Por lo que en los primeros 5 capítulos de este documento, se muestran los objetivos alcanzados, así como el por qué del desarrollo del proyecto, además de la importancia de llevarlo a cabo. En los capítulos 6 y 7 se habla sobre la sustentación teórica acerca de la bioimpresión 3D además del planteamiento de la metodología basándose en los fundamentos

anteriormente mencionados. Para el octavo capítulo se muestran los resultados obtenidos del proyecto, seguido del noveno capítulo, la discusión. Culminando con las conclusiones y recomendaciones para trabajos futuros que estén en esta línea de investigación.

La ingeniería de tejidos busca reparar, mejorar o reemplazar tejido biológico, por medio de scaffolds (andamios), células y bioimpresión 3D creando tejido específico para cada paciente [1]. Esto proporciona una solución a enfermedades degenerativas y lesiones que no pueden ser curadas por el cuerpo y abre las puertas a nuevas terapias hechas a la medida [2]. Existen varios métodos para la realización de tejidos artificiales entre los cuales destacan la impresión directa de biotintas con células [3], la impresión de scaffolds (andamios) biocompatibles con integración celular [4], el crecimiento de tejido en bioreactores [5] y muchos más.

La impresión 3D de tejido puede realizarse por medio de bioimpresoras 3D la cual se enfoca en el control de deposición de biomateriales (capa por capa) que pueden incluir proteínas, células y matriz extracelular suspendida y así formar una estructura 3D [2]. Estas impresoras pueden adquirirse comercialmente donde el costo de la impresora varía dependiendo de la cantidad de extrusores, la forma de esterilización, el tipo de biotinta, el método, la rapidez y resolución de la impresión. Dependiendo del tipo de impresora, existe flexibilidad en el tipo de biotintas a utilizar, los parámetros de impresión (velocidad, precisión, reproducibilidad) y el tamaño de objetos a imprimir [6]. Estas impresoras comerciales poseen muchos beneficios, pero usualmente están asociados a costos altos \$10,000 - \$200,000 [7].

En los últimos años la impresión 3D convencional ha tenido muchos avances, los cuales han llevado a una reducción drástica en el precio de los dispositivos para impresión y una mayor accesibilidad a esta tecnología [8]. Con esto se ha visto un incremento en el desarrollo de bioimpresoras de bajo costo a base de impresoras 3D convencionales modificadas para ser compatibles con métodos de bioimpresión [9]. Los principales factores que hacen esta alternativa atractiva a las bioimpresoras comerciales son la modificación del hardware y software de código abierto, por lo que no se requiere de un presupuesto alto [9].

El uso de biotintas en la bioimpresión 3D es imprescindible, donde según Lima, T., et al., los hidrogeles han sido un material muy utilizado debido a sus propiedades poliméricas, biocompatibilidad, estabilidad mecánica y su adhesión celular por su porosidad. Siendo utilizados principalmente para el diseño de tejido muscular, epitelial, vascular y de hueso. Por

lo tanto en 2019 [10], se demostró la factibilidad de desarrollar una bioimpresora 3D a partir de una impresora 3D de bajo costo, diseñando andamios a base de hidrogeles, mostrando la accesibilidad de implementarlo en áreas de investigación y desarrollo de biotintas.

En la actualidad, alrededor de 182,000 personas se encuentran en la lista de espera para el trasplante de un órgano en América Latina, de las cuales 10 mueren diariamente por no conseguir un órgano o no cumplir con los requerimientos de biocompatibilidad [11]. En Guatemala únicamente se cuenta con estadísticas sobre trasplantes renales, donde se encuentran aproximadamente 10,000 personas a la espera de un trasplante, y solamente 100 personas reciben un órgano al año [12]. La escasez de órganos y la dificultad para conseguir un donante, así como la alta prevalencia de enfermedades que requieren de un trasplante para salvar la vida del paciente exacerbaban la necesidad de alternativas viables a los órganos humanos.

La fabricación de órganos por medio de bioimpresoras 3D presenta una de las principales soluciones para combatir la escasez de órganos. Ya que se pueden utilizar materiales biocompatibles y células del mismo paciente, con estructuras y características similares a los órganos del cuerpo humano, aumentando drásticamente la integración exitosa del tejido con el paciente [13], por lo que reduciría exponencialmente el requerir de personas donantes, reduciría las complicaciones en las enfermedades de los personas con necesidad de trasplantes ya que los tiempos de espera disminuirían.

En la última década las bioimpresoras 3D han mostrado un gran avance en el campo de la medicina regenerativa, permitiendo desarrollar tejidos y órganos con redes vasculares [14]. Por medio de diferentes métodos de impresión como la estereolitografía. Técnica que utiliza luz ultravioleta (UV) para secar polímeros fotosensibles capa por capa, eliminando la necesidad de una boquilla, reduciendo los tiempos y mejorando la precisión de la impresión. Otro método muy utilizado es la bioimpresión basada en extrusión, la cual utiliza la presión neumática o mecánica para depositar material por medio de una boquilla, diseñada para tener una alta densidad de células en la impresión [15].

Un inconveniente de esta tecnología es el alto precio asociado a las bioimpresoras, el cuál se encuentra alrededor de \$10,000 - \$200,000, lo que dificulta su implementación en países de escasos recursos como Guatemala. Una alternativa viable para países como Guatemala se encuentra en la modificación de impresoras 3D convencionales por medio de la adición

de dispositivos compatibles con la extrusión e impresión de biotintas o hidrogeles para el cultivo celular y desarrollo de órganos y tejidos in vitro (<\$150) [16] [17] [18]. Modificando el mecanismo de extrusión de tal manera que pueda depositar el hidrogel con una velocidad y presión constante, haciendo que la estructura no colapse y permita que las células proliferen dentro de la impresión.

Por lo tanto, el desarrollo de una bioimpresora 3D en Guatemala, un país en vías de desarrollo, representa una oportunidad para explotar el desarrollo científico y tecnológico del país. Ofreciendo una alternativa innovadora y prometedora en el área de medicina regenerativa, promoviendo las investigaciones en el desarrollo de biotintas y scaffolds.

4.1. Objetivo general

Desarrollar un prototipo de una bioimpresora 3D de bajo costo modificando una impresora 3D convencional para la fabricación de estructuras tridimensionales usando material biocompatible.

4.2. Objetivos específicos

- Modificar el hardware y software de una impresora 3D implementando un sistema de extrusión por jeringa para depositar material biocompatible.
- Desarrollar un hidrogel de alginato de sodio y determinar el proceso óptimo de gelificación para implementarlo en impresión 3D.
- Verificar la influencia en el proceso de impresión del hidrogel en relación a la concentración del mismo, y la velocidad de impresión e identificar el diámetro de boquilla de jeringa adecuado para la impresión del hidrogel de alginato de sodio.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo el diseño e implementación de un prototipo de una bioimpresora 3D de bajo costo, modificando tanto hardware como software de una impresora 3D convencional. Durante el proyecto se demostrará el funcionamiento correcto del sistema de impresión para la creación de objetos simples en 2D utilizando un hidrogel a base de alginato de sodio, mientras que para impresiones tridimensionales, se espera que sus estructuras no sean estables. Este prototipo no contempla contar con un sistema de esterilización por lo que la integración de células junto al hidrogel no se puede implementar.

La bioimpresora fue diseñada y calibrada para emplear exclusivamente una jeringa de 20 ml. Por lo que el empleo de una jeringa diferente incidiría directamente en los resultados de la impresión. El sistema de extrusión fue ideado para trabajar con hidrogeles con concentraciones bajas, dada su baja viscosidad. Por último, es importante mencionar que, debido a que la manipulación del hidrogel no se llevó a cabo en condiciones estériles y en un entorno controlado, se espera que la impresión no alcance una biocompatibilidad óptima.

6.1. Ingeniería de tejidos

Es un campo interdisciplinario que aplica conocimientos de ingeniería y las ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función de un órgano o tejido [19]. Permite tener alternativas de tratamientos para pacientes con diferentes patologías que no sean curadas con la medicina común. La ingeniería de tejidos consiste en cultivar células en un biomaterial el cuál les permite crecer y alimentarse en un ambiente controlado [20]. En la Figura 1, abarcan los requerimientos para un tejido artificial. Siendo analizados in vitro, es decir, analizados afuera de su entorno natural. Para ver su comportamiento y observar su biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades mecánicas con el fin de prevenir que sea rechazado por el sistema inmune del paciente [20], cuando se implante.

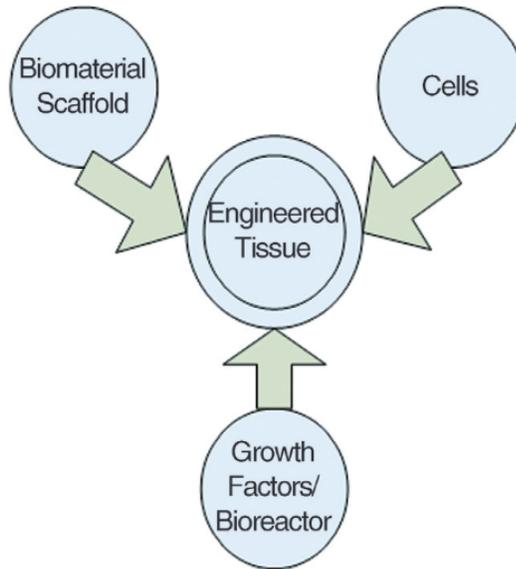


Figura 1: Requerimientos para el diseño de tejido artificial [20].

6.1.1. Scaffolds (andamios)

Los scaffolds son estructuras porosas, que permiten la integración de células dentro de sí para la formación de algún tejido en específico, esto con ayuda de factores de crecimiento o estimulación química o mecánica directamente a las células. Los scaffolds son cultivados de manera in vitro para controlar la proliferación de las células dentro del andamio y posteriormente implantarlo en el sitio de lesión, con el fin de producir una regeneración del tejido u órgano [20].

Un scaffold debe de cumplir con la forma anatómica original a reemplazar, por lo tanto debe de cumplir con la función principal, sin deformarse o dañarse. El scaffold debe de generar la regeneración del tejido segura y constante. Por último, debe de cumplir con la fijación, es decir que luego de su implantación, el tejido acepte al scaffold y genere una tejido circundante que evite que se mueva de su posición [21].

6.2. Impresión 3D

La impresión 3D es una técnica en la que mediante la fabricación aditiva de un material polimérico se genera un objeto tridimensional capa por capa. Iniciando por diseñar el objeto por medio del software asistido por computadora (CAD). Posteriormente, el modelo 3D es convertido a un archivo STL, archivo que guarda la información tridimensional del objeto por medio de coordenadas que permitirán que el equipo dé las instrucciones al sistema mecánico y pueda formar el objeto 3D capa por capa [22], Figura 2.

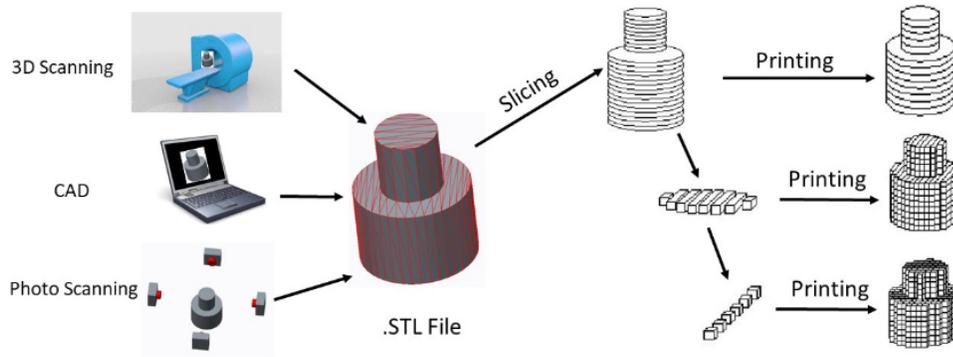


Figura 2: Procedimiento para impresión 3D [22].

6.2.1. Estereolitografía (SLA)

Método que fue patentado por Charles Hull en 1984, utiliza un rayo láser UV como fuente de luz que permite solidificar partes del material fotopolimerizable dando como resultado un objeto 3D con alta precisión [23]. Más a detalle consiste en un tanque de resina líquida; polímero fotosensible, que al entrar en contacto con el láser de luz UV solidifica la capa de resina con un patrón asignado por el software. El cabezal se sumerge hasta entrar a una distancia en la cual el láser UV pueda hacer efecto, para solidificar la capa, seguido de que el cabezal se levanta unos milímetros para seguir solidificando la siguiente capa hasta completar el modelo tridimensional [23], Figura 3a.

El objeto impreso, luego de terminar la impresión debe de ser curado usando una luz UV, para no perder sus propiedades mecánicas y reforzarlas a tal punto de hacer más rígida la estructura. Una de las ventajas de este método de impresión, consiste en la impresión de toda la capa a la vez, lo cual reduce el tiempo de impresión, además de tener una calidad de impresión buena, sin grumos ni desperfectos [23].

6.2.2. Modelado por deposición fundida (FDM)

Implementada y comercializada en 1990 por Stratasys Inc., USA. Esta impresora 3D utiliza un polímero en forma de filamento, el cual es calentado a punto de fusión por medio de una boquilla con sistema de calefacción. Posee un sistema que le permite moverse con 3 grados de libertad por toda la cama de impresión, donde el material se deposita en dicha cama capa por capa hasta lograr la forma y el tamaño del diseño requerido siguiendo las coordenadas del archivo G-code del objeto [24], Figura 3b. Este tipo de impresoras 3D tienen la ventaja de poder cambiar todas las piezas con el fin de mejorar su rendimiento y eficiencia, además de agregar más de una boquilla.

6.2.3. Sinterización selectiva por láser (SLS)

La sinterización selectiva por láser es una técnica utilizada mayormente con metal en polvo, consiste en utilizar la energía de un láser y fusionar selectivamente partículas de polvo

que se encuentran en la cama de impresión. En este tipo de impresoras 3D, se encuentran dos secciones, la primera donde se encuentra el polvo y la segunda donde se imprimirá la pieza. Esta última sección tiene la capacidad de moverse sobre el eje Z de tal manera que luego de haber fusionado y solidificado la primera capa, la plataforma de impresión se moverá hacia abajo, lo que permitirá que un rodillo desplace el polvo de la primera sección hacia la segunda, para fusionar la segunda capa y así sucesivamente hasta formar el diseño final. El exceso de polvo se recicla para futuras impresiones [25], Figura 3c.

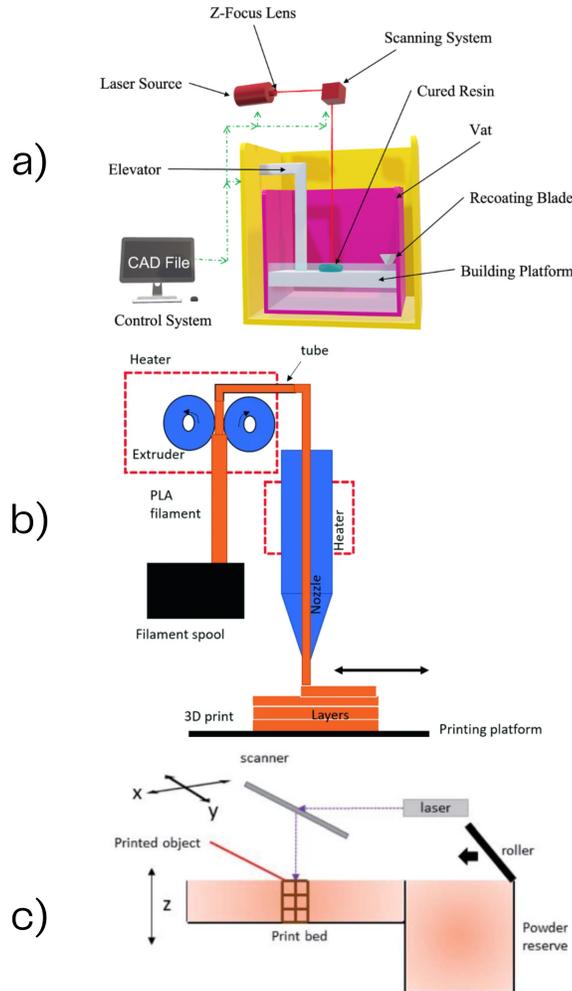


Figura 3: Representación esquemática de las técnicas de impresión 3D. a) Estereolitografía [23], b) FDM [24] y c) SLS [25].

6.3. Bioimpresión 3D

Es la unión entre las ciencias de la vida y la ingeniería, desarrollando estructuras con el uso de células vivas, factores de crecimiento, biotintas y el principio de manufactura aditiva para proveer estabilidad mecánica y promover el crecimiento celular. Con el fin de fabricar modelos que imiten la estructura, composición y función nativa de tejidos y órganos, para su uso en medicina regenerativa, ingeniería de tejidos e investigaciones biológicas y de

biocompatibilidad [13]. El proceso de la bioimpresión 3D requiere de ciertos pasos, Figura 4

- Escaneo 3D

Se procede a la adquisición de las imágenes médicas, ya sea por medio de resonancia magnetica (MRI), tomografía computarizada (CT) o tomografía por emisión de positrones (PET). Estas imágenes se segmentar de tal manera que se identifique la lesión y se tomen mediciones específicas.

- Diseño 3D

Se diseña un modelo digital tridimensional de la estructura por medio de un software de modelado 3D (CAD).

- Síntesis de la biotinta

La biotinta, es la materia prima para la bioimpresión 3D, contiene biomateriales y células vivas que le permiten asemejarse a la matriz extracelular y formar andamios que favorecen a la proliferación celular [26]. Para este proceso se debe de seleccionar correctamente a las células y al biomaterial por lo que se debe de tomar en cuenta sus propiedades mecánicas, biodegradabilidad y biocompatibilidad.

- Proceso de bioimpresión 3D

Empleando la biotinta elegida con anterioridad, se inicia con el proceso de impresión de la pieza, siguiendo las coordenadas del archivo CAD convertido a un archivo G-code.

- Maduración

Culminada la impresión, se cultiva de tal manera que produzca la proliferación de células, sí es este el caso. Se realizan análisis biológicos y pruebas mecánicas a la estructura.

- Aplicación

El último paso es la utilización, donde se somete el modelo bioimpreso a prueba in vivo y se analizan sus resultados [13].

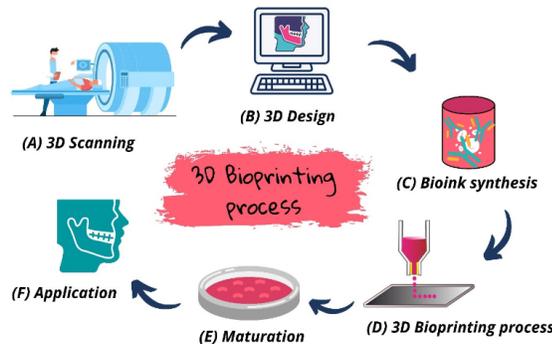


Figura 4: Proceso de la bioimpresión 3D [13].

6.3.1. Bioimpresión por extrusión

Método en el cual por medio de presión por aire o neumática, se deposita la biotinta por una boquilla hasta la cama de impresión de forma continua conforme al diseño de la estructura (Figura 5a). Permite imprimir con una alta densidad de células y viscosidad del hidrogel. Sin embargo, la resolución de impresión no baja de 100 μm por lo que no es recomendada para estructuras complejas ya que altera la morfología de las células y a medida que se reduce el diámetro de la boquilla, genera una alta presión de salida provocando que el motor de extrusión falle a tal punto de que se atore [15].

6.3.2. Bioimpresión por inyección de tinta

Método de impresión que forma burbujas de biotinta de tamaño micrométrico, que son depositadas con precisión en la estructura diseñada por computadora. Típicamente se utilizan dos métodos pero existen más, el primero con actuadores térmicos que al calentar la biotinta se forma una burbuja produciendo que sea expulsada. El segundo método es el piezoeléctrico, donde las gotas son generadas por ondas acústicas (Figura 5b). Este método de impresión impide imprimir biotintas con viscosidades altas y causa daños en la membrana celular al usar varias frecuencias [15].

6.3.3. Bioimpresión por láser

Técnica de manufactura aditiva, utiliza rayos ultravioleta (UV) para solidificar biopolímeros fotosensitivos (Figura 5c). Esta técnica al no utilizar una boquilla elimina cualquier presión sobre la biotinta, además de que mejora la resolución de impresión llegando a 5 - 300 μm por lo que le permite imprimir estructuras con microtubos. Debido al uso de UV, sin embargo, se tiene el riesgo de dañar y matar a las células que están en la biotinta [15].

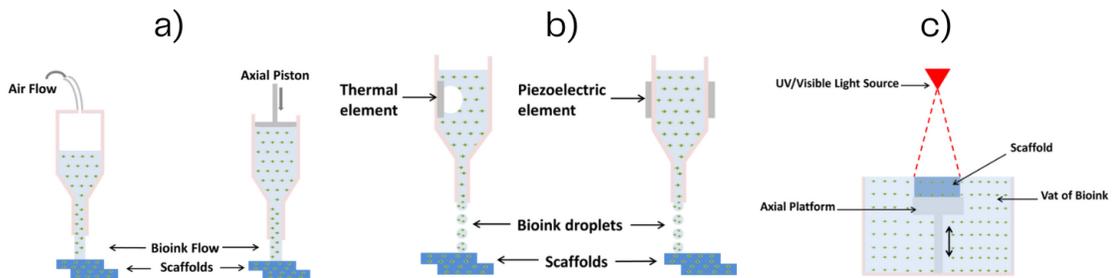


Figura 5: Representación esquemática de las técnicas de bioimpresión 3D. a) Por inyección de tinta, b) por extrusión y c) por láser [15].

6.4. Bioimpresoras comerciales

El mercado de las bioimpresoras ha experimentado un crecimiento sin precedentes, ascendiendo a 2,100 millones de dólares en 2021. Proyectándose que para el 2027 incremente

un 16.2%, alcanzando la cifra de 5,000 millones de dólares. Debido a que el mercado se está expandiendo, se ha generado una competencia entre las empresas de desarrollo de bioimpresoras, buscando destacar entre sus competidores [27].

En la actualidad empresas como 3D Bio Corp, Advanced Solutions Inc, Cellink y Organovo, son las empresas que se han consolidado en el área de la bioimpresión. El despliegue de las bioimpresoras se centra en centros de investigación universitarias, así como en centros de investigación privados, para investigaciones en el área de ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y el desarrollo de nuevos fármacos [27].

En términos de tecnología, los métodos de extrusión, inyección de tinta y por láser se destacan por los modos de bioimpresión más utilizados comúnmente. Diferenciándose una de las otras, desde la resolución, tiempo y materiales utilizados en la impresión [28].

En el Cuadro I, se mencionan las características principales de una bioimpresora comercial, como su método de impresión, el sistema de esterilización, rango de temperaturas de la boquilla y de la cama, volumen de impresión y el precio que se encuentra en el mercado. Se seleccionaron estas 3 bioimpresoras (Cellink BIO X, Allevi 1 y Regemat BIO V1), debido a que la forma de impresión que usan es una de las más usadas a nivel mundial. La bioimpresora BIO X, Figura 6.a, es una de la más comercializada a nivel mundial, la bioimpresora Allevi 1, Figura 6.b, es de la empresa 3D Systems la cual es un referente en el diseño y prototipado de piezas en 3D, mientras que Regemat, Figura 6.c, es una empresa de habla hispana y es de resaltar su capacidad de innovación.

6.4.1. CELLINK

Empresa sueca fundada en 2016, especializada en el área de biociencias, bioautomatización y bioimpresión. Comercializó la primera biotinta, seguido de eso la empresa desarrolló una amplia gama de bioimpresoras 3D como la BIO X, Figura 6.a. Bioimpresora basada en extrusión neumática, con sistema de esterilización UV con filtros HEPA H14, control de temperatura del cabezal entre 4°C-250°C y para la cama de impresión entre 4°C-65°C. Diseñada para la fabricación de Organ-on-a-chip, cultivo celular 3D, robótica blanda, entrega de medicamentos y modelos en ingeniería de tejidos [29].

6.4.2. ALLEVI by 3D SYSTEMS

Empresa fundada en 2021 por 3D Systems, para incorporar nuevas tecnologías como bioimpresión avanzada y medicina regenerativa en su portafolio, Figura 6.b. Allevi 1 es la bioimpresora de entrada, utiliza extrusión neumática de aire comprimido como método principal de extrusión. Los rangos de presión son de 3 a 100 PSI, posee un control de temperatura tanto en la boquilla como en la cama de impresión que va desde 4°C-160°C, puede optarse como fotocuración la luz UV o luz azul. Utiliza jeringas de 5mL compatibles con biomateriales como colágeno, matrigel, alginato, grafeno, entre otros [30].

6.4.3. REGEMAT

Empresa española, especializada en la fabricación y comercialización de bioimpresoras 3D y biomateriales, Figura 6c. BIO V1 es una bioimpresora 3D basada en extrusión por pistón que consiste en 3 cabezales intercambiables, con una boquilla adicional para imprimir material termoplástico. Posee un sistema de temperatura entre 20°C-100°C por boquilla, con opción de fotocurado del biomaterial con luz UV, infrarroja o luz azul. Con aplicaciones en la regeneración de tejidos, testeo de fármacos y desarrollo de biomateriales [31].

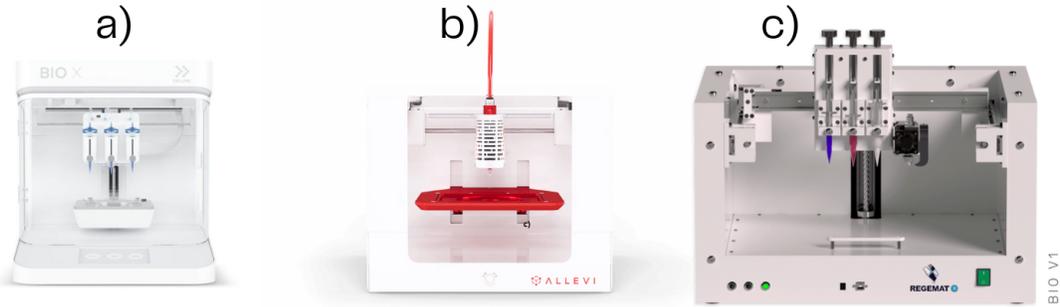


Figura 6: Bioimpresoras comerciales: a) BIO X [29], b) Allevi 1 [30] y c) Regemat Bio V1 [31].

Cuadro 1: Cuadro comparativo de bioimpresoras 3D comerciales.

Bioimpresora	Cellink	Allevi 1	Regemat
Método de impresión	Extrusión neumática	Extrusión neumática	Extrusión de pistón
Presión	0 - 36 PSI	3 - 100 PSI	—
Sistema de esterilización	UV con filtro HEPA 14	No cuenta	No cuenta
Temperatura del cabezal	4-250°C	4-160°C	4-250°C
Temperatura de la cama	4-60°C	4-160°C	No cuenta
Precio	\$36,000	\$20,000	\$25,000
Volumen de impresión	130x90x70 mm	90x60x130 mm	150x150x50 mm
Pais	Suecia	Estados Unidos	España

6.5. Biomateriales

Un biomaterial es un material destinado a la interacción con sistemas biológicos. Su función principal es la de sustituir, reemplazar, ayudar o reparar las funciones biológicas y mecánicas de algún órgano o tejido de forma segura. Una de las principales características que debe de cumplir es la biocompatibilidad, la norma ISO 10993, define a la biocompatibilidad como "la capacidad de un dispositivo o material médico para funcionar con una respuesta apropiada del anfitrión en una aplicación específica" [32]. Los biomateriales deben de ser diseñados para ser biodegradables, no tóxicos, que las características mecánicas sean adecuadas con respecto al lugar donde sera implantado. El diseño y las dimensiones del objeto deben ser consideradas si se va a implantar [33].

Los biomateriales se clasifican en:

- **Biológicos:** Material proveniente del huésped o donante, procede del tejido conjuntivo ubicado en los tendones, ligamentos y huesos. El colágeno es el biomaterial biológico más usado ya que es el encargado de generar la fuerza tensil a los tejidos conjuntivos [33].
- **Metálicos:** Se utilizan principalmente para reemplazar una parte del cuerpo, como implantes dentales para la fijación de los dientes, sustitución de articulaciones o huesos como la rodilla y el femúr. Los biomateriales metálicos se diseñan principalmente de una aleación de Co-Cr (Cobalto - Cromo) o Co-Cr-Ni (Cobalto - Cromo - Niquel) [33].
- **Poliméricos:** Tienen propiedades de elasticidad y de una degradabilidad muy rápida, sin embargo, no tienen propiedades mecánicas fuertes por lo que son propensos a la deformación con el tiempo. Los biomateriales poliméricos son hechos de nailon, siliconas, poliéster, entre otros. Su uso se frecuente normalmente en el hilo para suturas [34].
- **Cerámicos:** Su característica principal es la biocompatibilidad con el cuerpo debido a que son inertes y son resistentes al desgaste. Su desventaja es que son mecánicamente débiles. Los biomateriales cerámicos están hechos principalmente de hidroxiapatita y carbono y su principal aplicación es en el área ortopédica [33].

Cada una de sus características les permite adaptarse al entorno, evitando cualquier daño dentro del tejido u órgano y en el caso del uso de células, permitirle a las células un crecimiento óptimo dentro del biomaterial [33].

6.5.1. Hidrogel

Es un material de cadenas poliméricas hidrofílicas, característica que les permite absorber grandes cantidades de agua dentro de su estructura además de poseer una resistencia a la disolución debido al entrecruzamientos de sus cadenas poliméricas, llegando a soportar altas temperaturas para ciertos casos. Son materiales flexibles y blandos, se clasifican según:

- **Fuente de origen:** Los hidrogeles pueden clasificarse en dos grandes grupos, el primero obtenido de manera natural y el segundo grupo son producido sintéticamente [35].
- **Composición polimérica:** Dependiendo de la forma de preparación del hidrogel, se pueden agrupar en hidrogeles homopoliméricos, construidos a partir de una sola especie de monómero. Los hidrogeles copoliméricos se componen de dos o más clases de monómeros, donde al menos uno de ellos es hidrofílico. Por último, los hidrogeles multipoliméricos son formados por dos cadenas de hidrogeles distintas [35].
- **Configuración:** Según su estructura física se clasifican en hidrogeles amorfos, semicristalinos y cristalinos [35].
- **Tipo de cross - linking:** Se dividen en dos grupos debido a el entrecruzamiento de las redes, las redes químicamente unidas poseen uniones permanentes mientras que las redes físicas, debido a que interaccionan con iones y otras cadenas poliméricas sus uniones son transitorias [35].

- Carga eléctrica: Los hidrogeles se pueden dividir dependiendo su carga eléctrica, aquellos que poseen carga neutra, iónica, anfóteras y zwitteriónicos. Los hidrogeles más utilizados de este grupo son el ácido hialurónico que es un polímero aniónico, el quitosano el cual es un polímero catiónico [36].

6.5.2. Hidrogeles usados comúnmente en la bioimpresión 3D

El uso de hidrogeles en bioimpresión 3D se debe a que son capaces de encapsular a las células permitiéndoles mantener un alto grado de viabilidad celular. Es un material biocompatible, lo cual reduce el daño del tejido circundante de la implantación, en caso de ser implantado. Puede ser diseñado con diferentes porosidades lo que permite que se cree un microambiente en el cual hay intercambio de gases y nutrientes de las células [35].

Las ventajas de utilizar los hidrogeles en el área de ingeniería de tejidos se debe a que son buenos transportadores de nutrientes, permiten su modificación fácilmente con la adhesión de células, poseen un entorno acuoso lo que da protección a las células. Las desventajas del uso de hidrogeles, se da en la difícil manipulación ya que se espera que este estéril y normalmente los hidrogeles son mecánicamente débiles [36].

- Agarosa: Es un biopolímero derivado del agar, se extrae de las algas marinas. Compuesto por D-B-galactosa (D-Gal) y 3,6- anhidro- α -L-galactosa (L-AHG) (Figura 7a). Entre sus ventajas esta su gran biocompatibilidad así como buenas propiedades mecánicas, mientras que sus desventajas se encuentra su baja proliferación de células. La agarosa se utiliza mayormente para tejido vascular y de cartílago [13].
- Ácido hialurónico: Es un glucosaminoglicano que no tiene sulfatos en su estructura (Figura 7b), se encuentra en los tejidos conectivos de los seres humanos y en la matriz extracelular. Es un hidrogel de buena proliferación celular así como mantener una homeostasis del cartílago. Al igual que todos los hidrogeles posee malas propiedades mecánicas por lo que es frecuente ver una mezcla del ácido hialurónico con otros compuestos para aumentar sus propiedades mecánicas [37].
- Colágeno: El colágeno es una biomolécula que se encuentra en todos los tejidos conectivos del cuerpo. Representa el 25 % del peso neto seco de un mamífero y se encuentra formando una estructura de triple helice, compuesta por miles de aminoácidos con la secuencia de Gly-X-Y- (Figura 7c) [38]. Se sabe que hay hasta 6 tipos de colágeno (I - XI), pero en la ingeniería de tejidos se utiliza más el colágeno tipo I ya que se encuentra en el tejido musculoesquelético, presenta una correcta adhesión de las células así como una buena biocompatibilidad [13].
- Alginato de Sodio:
Es un polisacárido proveniente de algas marinas, compuesto por ácido -D-manurónico y ácido -L-glucurónico unidas por enlaces (1-4) (Figura 8a). Es un polisacárido soluble en agua lo que permite formar hidrogeles. Usualmente se utiliza cloruro de calcio (CaCl_2) como reticulante, el cloruro de calcio es una sal soluble en agua que posee cationes de calcio (Ca^{2+}) los cuales reaccionan formando puentes iónicos con las cadenas lineales de alginato estabilizando la estructura mediante la unión de los ácidos

glucurónicos [39] (Figura 8b). El uso de alginato de sodio en bioimpresión 3D se debe a su versatilidad, propiedades mecánicas y biocompatibilidad. Dependiendo de su aplicación puede cambiarse la concentración con el fin de modificar la porosidad, propiedades mecánicas, viscosidad y degradación [39]. Por lo que a medida que aumenta la concentración, la porosidad disminuye, lo que significa menos espacio entre las cadenas poliméricas. Afectando directamente en la integración celular, ya que disminuye la difusión de nutrientes y factores de crecimiento, impidiendo la proliferación celular dentro de la estructura. Sin embargo, a mayor concentración de alginato de sodio se forman estructuras más firmes y robustas teniendo así una mayor resistencia mecánica [39].

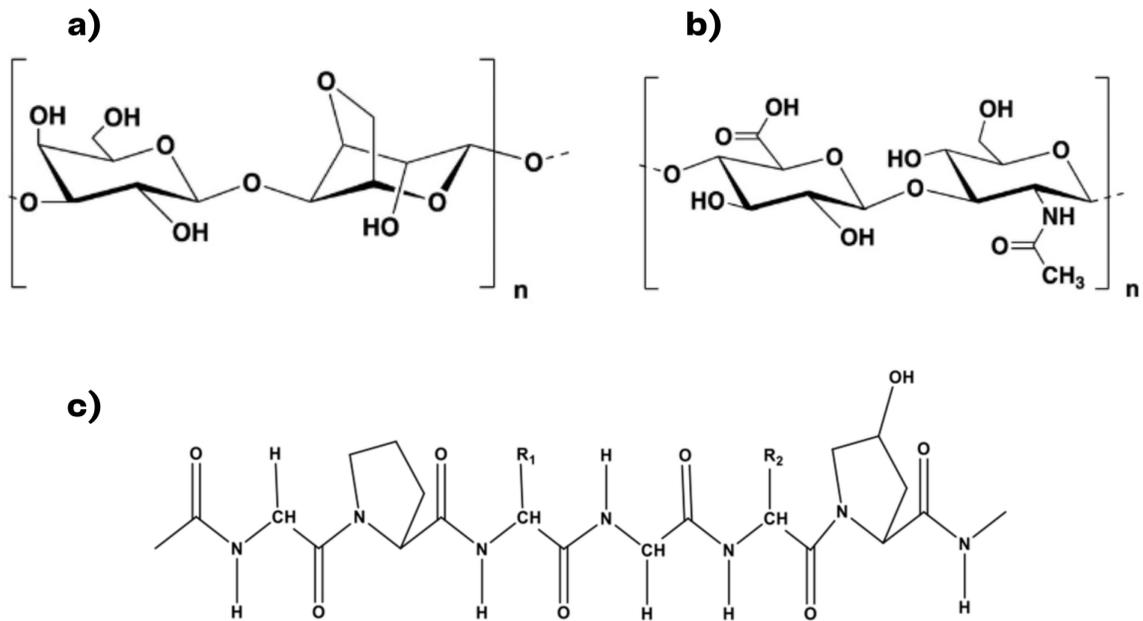


Figura 7: Estructura química de a) Agarosa, b) Ácido hialurónico [39] y c) Colágeno Tipo I [40].

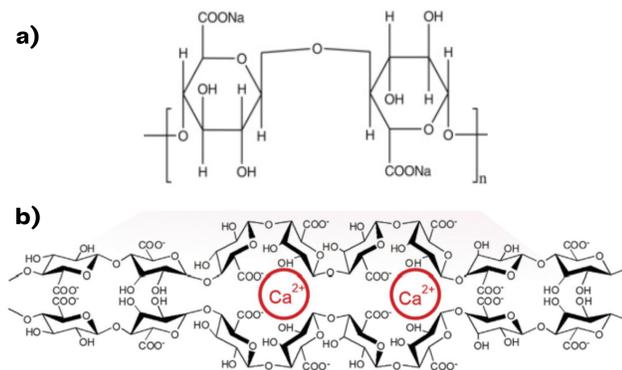


Figura 8: a) Estructura química del Alginato de Sodio [41] y b) Interacción entre el Alginato de Sodio y el Cloruro de Calcio (CaCl₂) [42].

6.6. Avances en la bioimpresión 3D utilizando Alginato de Sodio como biotinta

6.6.1. Tejido vascular

En bioimpresión 3D el alginato de sodio se a usado para crear tejido vascular, como son los vasos sanguíneo, se imprimen usando una boquilla extra con la finalidad de imprimir el alginato de sodio en conjunto con los nutrientes necesarios para la supervivencia y proliferación de las células progenitoras de cartílago [43].

6.6.2. Fabricación de hueso

A los largos de los años se han diseñado nuevas formas de imprimir hueso y una de ellas se diseñada a partir de un proceso de dos pasos. El primer paso mezcla la gelatina junto a la hidroxiapatita. La hidroxiapatita es la que le confiere la dureza y rigidez similar a la de un hueso. En el segundo paso de manera química, se produce la reticulación del alginato de sodio. Se mezcla la gelatina, hidroxiapatita y el alginato de sodio y además se integran células madres mesenquimales, las cuales tienen la capacidad de autorenovación y regeneración ósea [43].

7.1. Especificaciones de la impresora 3D

Para el desarrollo del proyecto se contó con una impresora 3D, hecha por el departamento de Ingeniería Mecatrónica, Electrónica y Biomédica. Se fabricó utilizando la cortadora láser del departamento y los componentes de la impresora 3D se compraron por separado. El departamento se basó en las siguientes especificaciones para el desarrollo de la impresora 3D.

- Marca: RepRap Prusa i3
- Precio: \$100 - \$150
- Placa Madre: Ramps 1.4
- Dimensiones: 475x410x458 mm
- Dimensiones de impresión: 200x200x200 mm
- Grosor de líneas: 0.1 - 0.4mm
- Resolución máxima: 0.1 mm
- Resolución en X y Y: 0.012 mm
- Resolución en Z: 0.004 mm
- Firmware: Marlin 2.1.1



Figura 9: Impresora 3D antes de las modificaciones.

7.2. Modificación de software

7.2.1. Modificaciones de Firmware Marlin 2.1.1

Para modificar una impresora 3D a una bioimpresora 3D se debe de realizar ciertos cambios en las líneas de código del Firmware, de tal manera que el mecanismo de extrusión sea compatible al movimiento de la impresora 3D. Las modificaciones que se realizan se encuentran en el archivo Configuration.h, para esto es indispensable descargar el firmware Marlin 2.1.1 para el modelo Prusa i3 (Prusa Research, Praga, República Checa). Los parámetros modificados se en listan en el Cuadro 2, estos parámetros permiten imprimir a temperatura ambiente sin calentar la cama caliente y que la misma impresora no reconozca que es un error, además de calibrar la cama de manera manual y que los steps per units se adecuen a la extrusión de 1 ml y no de 1 mm de filamento.

Cuadro 2: Modificaciones de código en Firmware Marlin 2.1.1.

Antes	Ahora	Explicación
<code>#define TEMP_SENSOR_0 5</code>	<code>#define TEMP_SENSOR_0 1</code>	Se selecciona en el firmware el valor según el termistor usado
<code>#define TEMP_SENSOR_BED 1</code>	<code>#define TEMP_SENSOR_BED 0</code>	0 debido a que no se esta usando
<code>#define PREVENT_COLD_ EXTRUSION</code>	<code>comentar // #define PREVENT_COLD_ EXTRUSION</code>	Para que la impresora imprima a temperatura ambiente
<code>#define EXTRUDE_MINTEMP 5</code>	<code>comentar // #define EXTRUDE_MINTEMP 5</code>	Para que la impresora no genere una alarma
<code>#define DEFAULT_AXIS_ STEPS_PER_UNIT { 80, 80, 400, 837 }</code>	<code>#define DEFAULT_AXIS_ STEPS_PER_UNIT { 80, 80, 400, 1400 }</code>	Se modificó el valor del extrusor según valores experimentales
<code>// #define PROBE_MANUALLY</code>	<code>descomentar #define PROBE_MANUALLY</code>	Para calibrar la impresora manualmente
<code>#define BLTOUCH</code>	<code>comentar // #define BLTOUCH</code>	Se comentó ya que no se esta utilizando
<code>#define Z_SAFE_HOMING</code>	<code>comentar // #define Z_SAFE_HOMING</code>	Para no guardar el valor de home y poder seleccionarlo uno mismo

7.2.2. Creación de G-code para el inicio y finalización de una impresión

Para el inicio y finalización de la impresión se debe de crear un código de G-code, lenguaje de comunicación entre la impresora y el computador debido; que envía coordenadas espaciales para producir el movimiento del extrusor. Como se está utilizando una caja de petri. La jeringa no debe de topar con los bordes de la caja de petri; con el fin de prevenir daños a la jeringa y sobre todo al objeto impreso. Comparando el inicio de impresión, en una impresora 3D convencional, el extrusor se mueve a las coordenadas (0,0,0) para extruir filamento y luego moverse a el centro de la impresora para comenzar a imprimir. Mientras que para una bioimpresora, se ubica manualmente la posición donde comenzará la impresión (Figura 10). En la finalización de la impresión, la bioimpresora únicamente levanta el cabezal de impresión cierta distancia para no topar con la caja de petri, mientras que la impresora

3D ejecuta una rutina, que luego de finalizada la impresión, el cabezal de impresión se mueve a las coordenadas (0,0,0) (Figura 10), esta explicación se muestra en código G-code en el Cuadro 3.

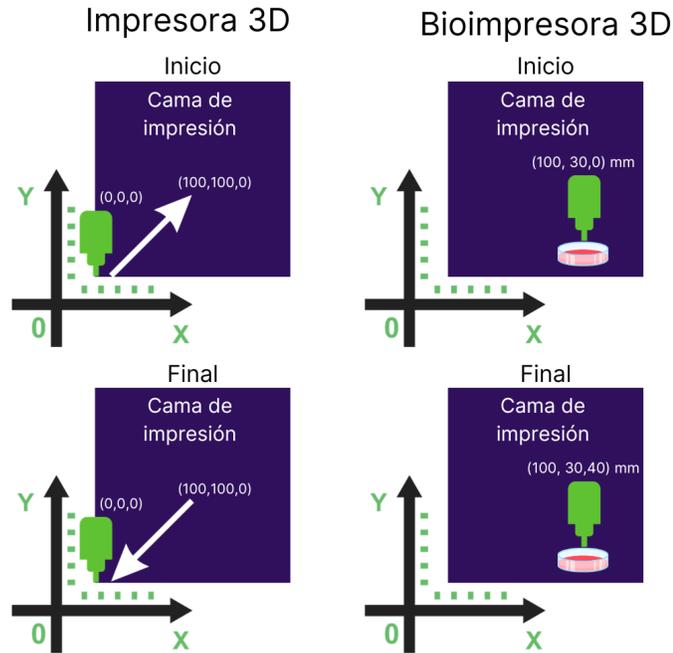


Figura 10: Diferencia entre el inicio y final de una impresora 3D y una bioimpresora 3D.

Cuadro 3: Creación de G-code para la bioimpresora.

Start G-code	Finish G-code
M82 ; G92 X0 Y0 Z0 E0 ;	M400 ; G1 E-0.2 F30; G1 Z30 F100; G90 ; M18 X Y E ; M82;

7.2.3. Boquillas G18 y G20

Para el desarrollo de este proyecto, se seleccionaron dos boquillas G18 (Figura 11a) y G20 (Figura 11b), ambas usadas en los procesos de bioimpresión 3D. Sus especificaciones se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4: Especificaciones de las boquillas G18 y G20.

Boquilla	G18	G20
Diámetro externo	1.27 mm	0.9 mm
Diámetro interno	0.84 mm	0.58 mm
Color	Verde	Rosado

a) G18 b) G20



Figura 11: Boquillas para jeringas a) G18 y b) G20.

7.2.4. Creación de perfiles en Cura Lulzbot

Debido a que se realizan impresiones con diferentes tamaños de boquilla G18 y G20 (0.84 mm y 0.60 mm de diámetro respectivamente), se deben de crear perfiles distintos, debido a la diferencia entre los diámetros internos de cada boquilla. Se modificó el parámetro de Layer Height a un 40 % respecto al valor del diámetro de la boquilla (Anexo, Cuadro 6), esto para que al extruir el hidrogel no se sature y genere presión. Las demás modificaciones se encuentran en los Cuadros 7 y 8 donde se establecieron los parámetros específicos para cada perfil usando Cura Lulzbot (Fargo Additive Manufacturing Equipment 3D, LLC, ND, USA). Para todas las boquillas se establece el flujo de la primera capa (Initial Layer Flow Rate) al 100 %, la velocidad de impresión (Print Speed) se ajusta de 20 mm/s a 23 mm/s, un Infill al 100 % y un Patrón de Zig Zag.

7.3. Modificación de hardware

7.3.1. Modificación de hardware de la impresora 3D

Para que la impresora sea compatible para una bioimpresora 3D se debe de modificar componentes de hardware; se deben de desconectar de la placa madre RAMPS 1.4 los cables ubicados en los pines del ventilador, el sensor de temperatura, la cama caliente y el sensor BLTouch, en la Figura 12, se encierran en un cuadro negro, todos aquellos componentes que se deben de desconectar, el sensor BLTouch está encerrado como el final de carrera del eje Z. Se debe desmontar el sistema de extrusión retirando todos los componentes dejando únicamente el motor stepper y sus pines conectados.

Para el diseño del nuevo sistema de extrusión se utiliza Inventor Autodesk. El diseño consta de dos piezas, la parte fija (Figura 13b) sus dimensiones se encuentran en (Anexos, Figura 31), que estará conectada a la base del extrusor original y estará soportando al motor stepper, las varillas y la pieza móvil (Figura 13a) sus dimensiones se encuentran en (Anexosm Figura 32), que se moverá en el eje z de arriba hacia abajo de modo que pueda presionar a la jeringa para extraer el líquido. La pieza móvil, será el soporte para los cojinetes además de la tuerca trapezoidal. El diseño mide 56x185x50 mm, Figura 13

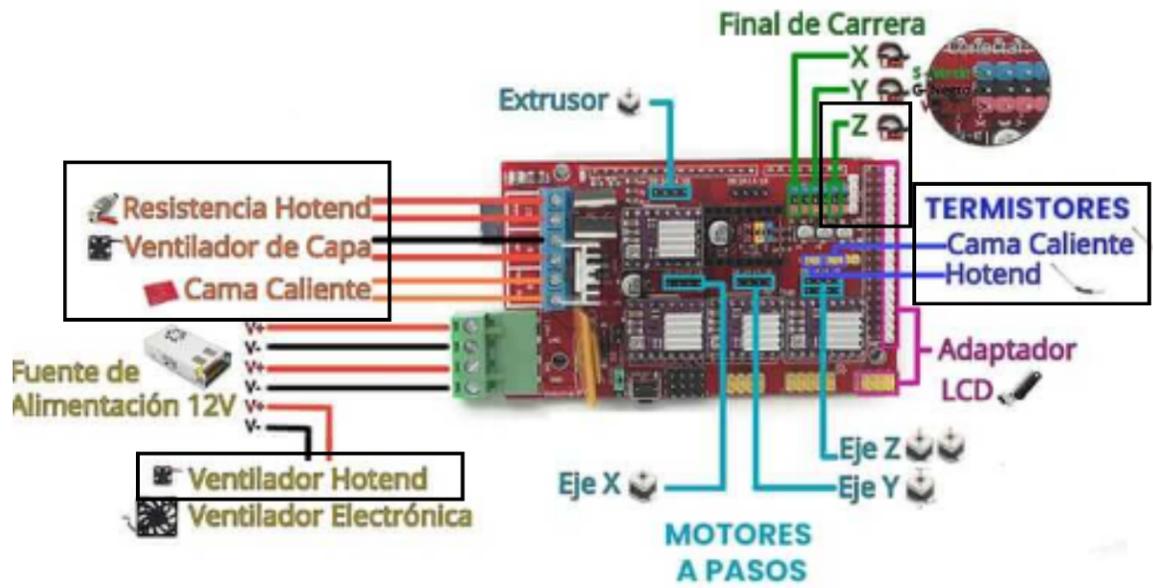


Figura 12: Placa madre: Ramps 1.4 pinout [44].

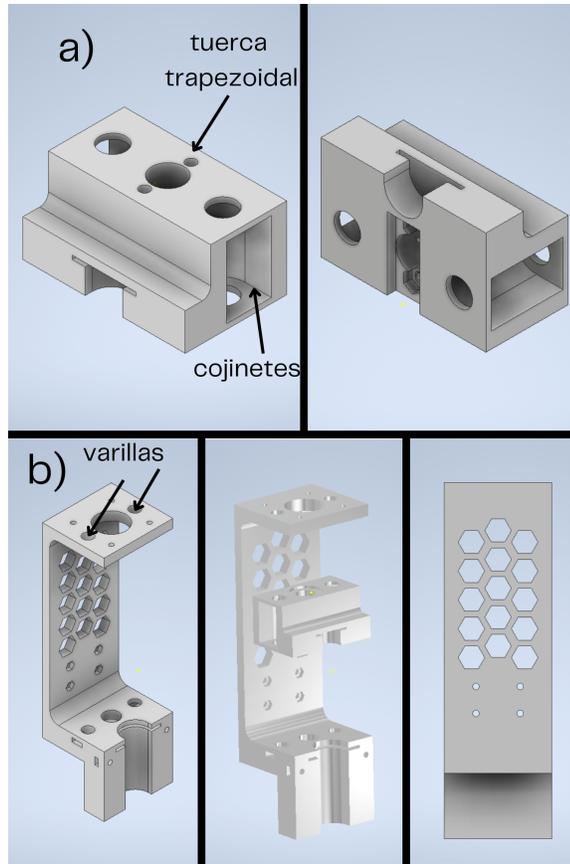


Figura 13: Sistema de extrusión modelado en Inventor.

7.3.2. Calibración del sistema de extrusión por jeringa

Implementado el sistema de extrusión se debe de calibrar el mecanismo, para determinar si la cantidad programada del líquido es la correcta. Para ello se desmonta el sistema de extrusión de tal manera que pueda ser colocado por encima de una balanza analítica (Explorer OHAUS, precisión 0.1 mg) usando pinzas de laboratorio que soporten el mecanismo (Figura 14). Se debe llenar la jeringa con agua ultra pura y colocarla en su posición.

Utilizando Pronterface, software que permite monitorizar y enviar comandos a la impresora, se realizarán pruebas de extrusión a una cantidad de 1 ml, 3 ml y 5 ml a diferentes velocidades (10 mm/min, 20 mm/min y 30 mm/min). En Pronterface se irá variando el valor de M92, el cual está sujeto a la cantidad de pasos que el motor ejerce para moverse linealmente 1 mm. Así que se establece una conexión entre el movimiento lineal y un desplazamiento volumétrico de 1 ml. Para eso se debe de guardar el valor que se encontró usando el comando M92 EX, comando con el cual se configuran los pasos del motor stepper para moverse una unidad, el valor X es el valor que se estará variando hasta encontrar el valor que extruya 1 ml. Para guardar el valor se debe de usar el comando M500, comando que guarda los cambios en la impresora.

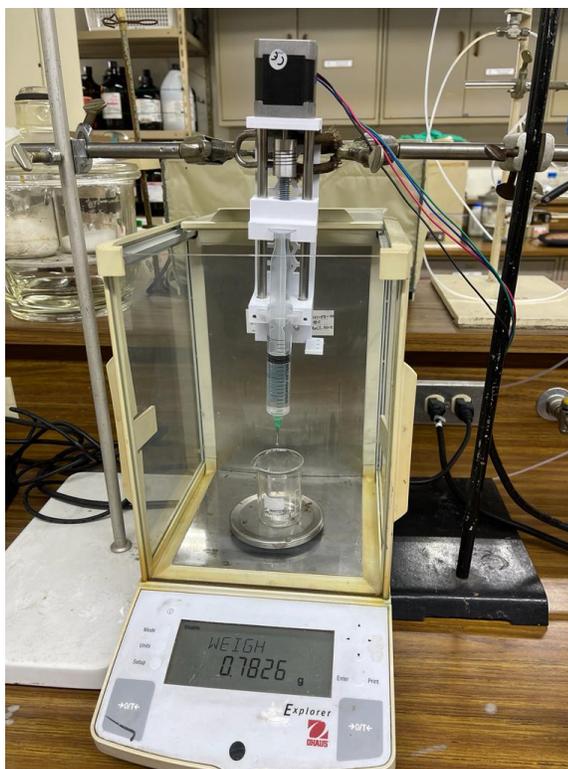


Figura 14: Integración de la balanza analítica con el sistema de extrusión.

7.4. Desarrollo y caracterización del hidrogel

7.4.1. Síntesis del hidrogel: Alginato de Sodio

Para la síntesis del Alginato de Sodio, se requiere agregar 50 ml de agua destilada a un beaker de 100 ml, agregando al beaker un agitador magnético. Para este paso se utiliza la estufa únicamente en modo de agitación. Según la concentración a realizar se deberá de agregar, 1 g de alginato de sodio para una concentración al 2 %, 1.5 g de alginato de sodio para una concentración al 3 %, 2.5 g de alginato de sodio para una concentración al 5 % y 4 g de alginato de sodio para una concentración al 8 %. Se agrega lentamente el alginato de sodio al beaker, hasta que quede una mezcla homogénea, esto puede durar entre 25-35 minutos. Por último se transfiere el hidrogel a un tubo de centrifuga de 40 ml, dejándolo refrigerado hasta que desaparezcan las burbujas, este proceso dura 30 minutos aproximadamente.

7.4.2. Síntesis del Cloruro de Calcio (CaCl_2)

Para la síntesis del CaCl_2 , se requiere agregar 40 ml de agua destilada a un tubo de centrifuga de 50 ml. Se debe de agregar según la concentración a realizarse, 2 g para una concentración de 450 mM de cloruro de calcio, 4 g para una concentración de 900 mM cloruro de calcio y 6 g para una concentración de 1.35 M cloruro de calcio. Estos pesos

deben de realizarse en una balanza analítica para ser precisa la medición. Se agrega al tubo de centrifuga y se agita usando el Vortex durante 3-5 minutos, luego se coloca en una centrifugadora por 5 minutos a 2000g a temperatura ambiente y por último se deja refrigerando hasta el momento de utilizarse.

7.5. Parametrización de la bioimpresora 3D

7.5.1. Prueba de parametrización

Se realizará una parametrización utilizando como base las distintas concentraciones del hidrogel (2%, 3%) y el cloruro de calcio (450 mM, 900 mM y 1.35 M). Usando todas las boquillas 18G y 20G para ver su comportamiento a diámetros de boquilla distintos. Por lo que la prueba consiste en realizar una línea recta de 3cm, a mano alzada. Se realizaron 6 pruebas por boquilla, de las cuales 3 utilizaron el hidrogel al 2% y las 3 restantes al 3%. De las 3 pruebas utilizando el hidrogel al 2% cada una de ellas se gelificó con cada una de las concentraciones de CaCl_2 . Es decir una prueba gelificada al 450 mM de CaCl_2 , otra a 900 mM de CaCl_2 y la última a 1.35 M de CaCl_2 .

7.5.2. Parametrización de impresión 3D

Se realizarán 5 pruebas de impresión, de las cuales 4 pruebas, el diseño a imprimir fueron 3 líneas del grosor de la boquilla G18, la distancia entre cada línea fue de 4 mm, cada una de las pruebas fue a distintas concentraciones de alginato de sodio (2%, 3%, 5% y 8%) (Figura 15a) . La siguiente prueba será imprimir una onda senoidal con el grosor de la boquilla G18 (Figura 15b). Estas pruebas de impresión se midieron utilizando un estereoscopio para medir la distancia real que hay entre cada línea y el grosor de las mismas.

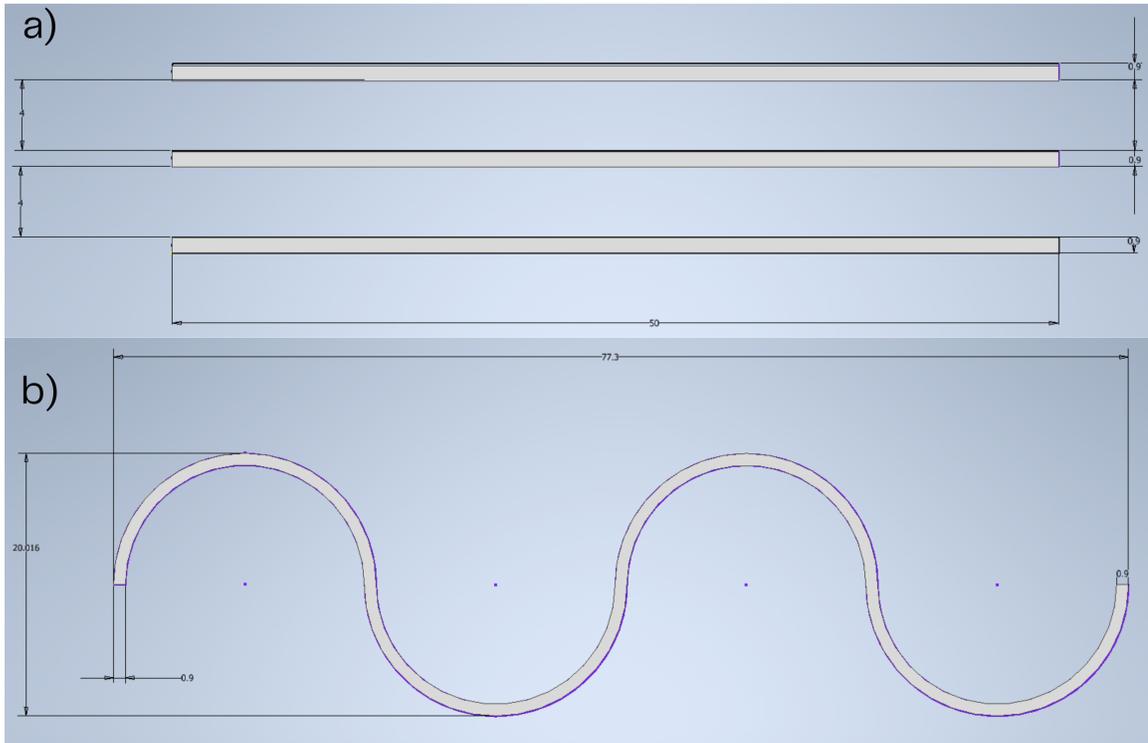


Figura 15: Diseños digitales para parametrización a) 3 líneas con separación de 4 mm entre cada uno, 0.9 mm de grosor y 50 mm de largo. B) onda senoidal 20 mm de alto, 77 mm de largo y 0.9 mm de grosor.

Utilizando el software de Cura Lulzbot se modificaron los parámetros de Infill, Flow, Initial Layer Flow Rate y Top/Bottom Pattern, para seleccionar la impresión más uniforme. Por lo que se realizaron 5 pruebas de impresión, con un diseño de un cuadrado de 40x40x0.5 mm (Figura 16). Los parámetros de Flow y Initial Layer Flow Rate fueron constantes para las 5 pruebas 75 % y 80 % respectivamente mientras que el parámetro de Top/Bottom Pattern fue Lineal para las primeras 4 pruebas mientras que para la quinta prueba fue ZigZag. El parámetro de Infill para la primera prueba fue del 15 %. Para la segunda prueba fueron del 50 % , tercera prueba con un valor de 75 % y para la cuarta y quinta prueba fue del 100 %. Se validó una vez más la pieza con mayor uniformidad para validar el resultado, fue la sexta prueba.

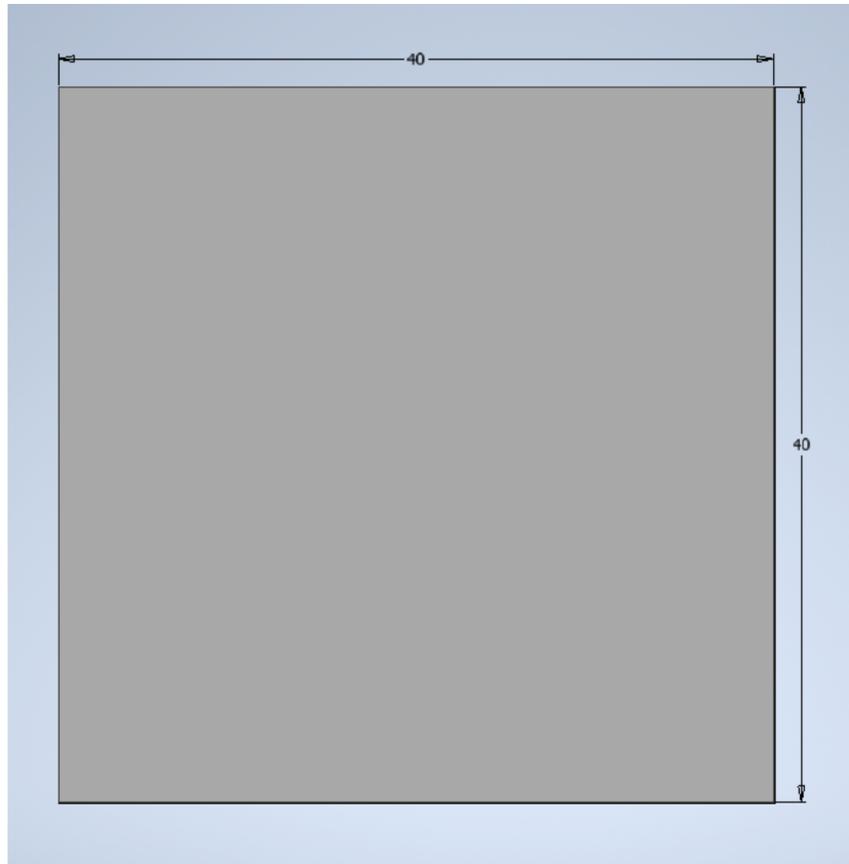


Figura 16: Cuadrado digital para parametrización, 40 mm de alto por 40 mm de largo.

7.5.3. Prueba de impresión con boquilla G18 y G20

Se realizarán 6 pruebas de impresión utilizando una boquilla G18 y otras 6 pruebas para una boquilla G20, el objeto a imprimir es un cuadrado 50x50x0.5mm (Figura 17a), para la boquilla G20 se imprimieron 3 cuadrados y 3 hexágonos de vértice a vértice medirá 40 mm (Figura 17b). En tres pruebas se usó el hidrogel de alginato de sodio al 2% y las tres restantes se usó el hidrogel de alginato de sodio al 3%. De las tres pruebas con el hidrogel al 2%, cada una de ellas fueron gelificadas con cada una de las concentraciones de CaCl_2 , 450mM, 900mM y 1.35M. De la misma manera para las tres pruebas con el hidrogel al 3%.

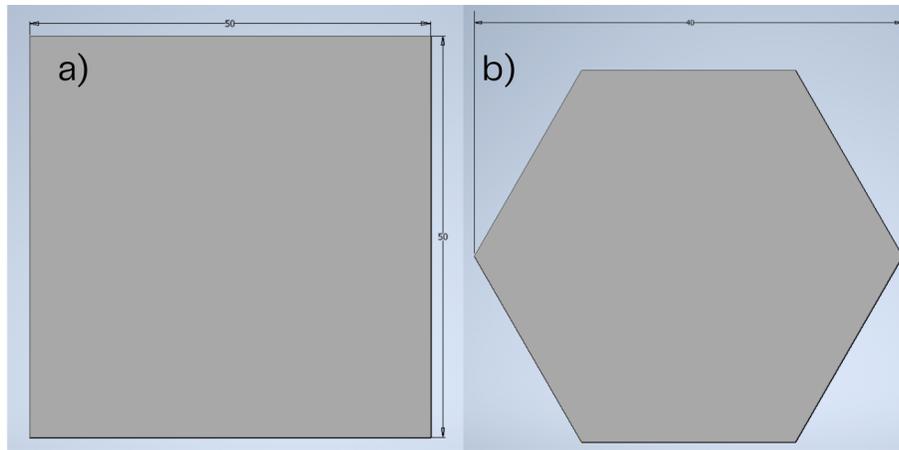


Figura 17: a) Cuadrado digital para parametrización, 50 mm de alto por 50 mm de largo y b) Hexágono digital, 40 mm de vértice a vértice.

7.5.4. Prueba de impresión con Alginato de Sodio al 5 % y 8 %

Se realizaron 6 pruebas de impresión utilizando una boquilla G18, en dichas pruebas se imprimió un cuadrado de 40x40x0.5 mm (Figura 16). En estas pruebas se imprimieron 3 objetos con alginato de sodio al 5 % y otras 3 con alginato de sodio al 8 %. Cada una de las estructuras se gelificaron con cada una de las concentraciones de CaCl_2 .

8.1. Software

La modificación del firmware Marlin 2.1.1 permitió que la impresora no emitiese una alerta e imprimiera a temperatura ambiente. Además, se permitió que la calibración de la impresora sea de manera manual, nivelando desde los ajustadores ubicados en cada esquina de la cama de impresión. En cuanto a la rutina de G-code creada, el inicio de la impresión facilitó comenzar desde el punto exacto donde se dejó la boquilla, en contraste con una impresora 3D convencional que sigue una rutina que mueve el extrusor a home (0,0,0) (esquina inferior izquierda de la cama de impresión), seguido de la extrusión de filamento antes de levantarse para la impresión (Figura 10). Al finalizar con la impresión, se ejecutó un movimiento en el eje Z para elevar la boquilla evitando el contacto con el diseño impreso y la caja de petri, finalizando con la desconexión de los motores steppers de la impresora. En comparación, una impresora 3D convencional, tras finalizar la impresión, se dirige a home, se mueve en el eje Z, finalizando con la desconexión de los motores steppers, el extrusor y la cama caliente.

8.2. Hardware

Para el sistema de extrusión mecánica se requirieron tres iteraciones del diseño hasta alcanzar un estado funcional. El primer diseño (Figura 18, a-c) estableció las dimensiones generales y el método de montaje sobre la impresora, sin embargo, no era posible el ensamble total del sistema debido a las dimensiones de los agujeros para las varillas de soporte. Las varillas tienen un diámetro de 8 mm y el primer diseño tenía aperturas de 8 mm, lo que imposibilitaba la inserción de las varillas (Figura 18b).

La versión dos del extrusor resolvería este problema al incrementar el diámetro del orificio a 9 mm (Figura 18, d-f). En esta versión si era posible la inserción de las varillas, pero el espacio era tan grande que las varillas producían un movimiento indeseado, causando inestabilidad en todo el sistema de extrusión. A su vez, se observó que el sensor BLTouch entraría en contacto directo con la caja de petri, lo cual era indeseable, por lo que se optó por remover del diseño el soporte del BLTouch. Otro problema que se encontró fue la ubicación del sistema de anclaje, que se encuentra en la parte inferior del diseño (Figura 18a), generando un movimiento oscilante en la parte superior donde se encuentra ubicado el motor stepper.

La tercera versión (Figura 18, g-i), se modificó el ancho del diseño, pasando de 50 mm a 56 mm, con el fin de generar una mayor estabilidad. Esta versión resolvería el problema de los orificios para las varillas, cambiando su diámetro a 8.2 mm, mejorando la sujeción y evitando movimientos no deseados. Asimismo, se modificó la posición del sistema de anclaje, pasando al centro del sistema para reducir los movimientos. Esta versión ya no cuenta con el soporte para el sensor BLTouch.

Para esta última versión, se crearon dos modelos para el sistema que soporta a los cojinetes y permite el movimiento de extrusión de la jeringa en el eje Z. Uno de ellos diseñado para una varilla roscada de acero inoxidable con una tuerca de 3/8 (Figura 19, c-d), mientras que el otro sistema se diseñó para una varilla roscada de 8 mm con una tuerca trapezoidal T8 (Figura 19, e-f). Todos los diseños del sistema de extrusión se imprimieron con PLA, filamento que posee una gran resistencia a movimientos bruscos y al calor.

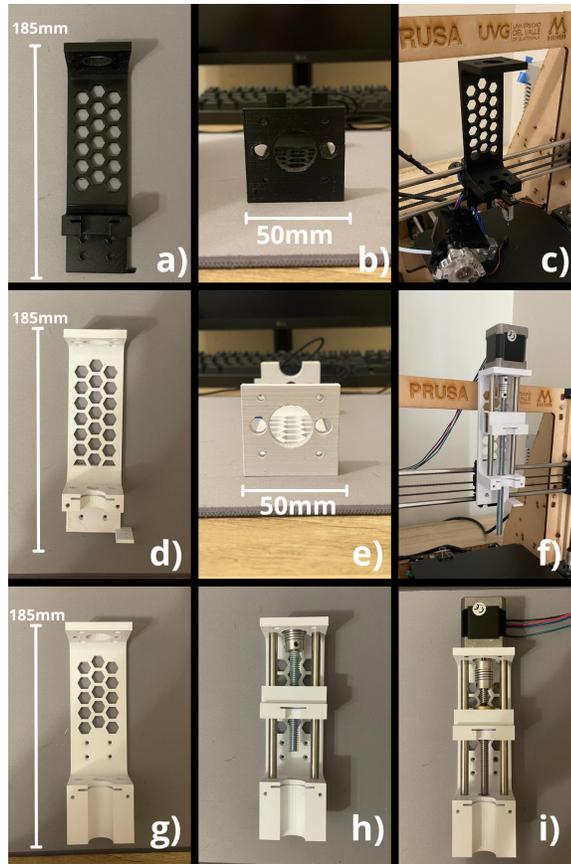


Figura 18: Modelos diseñados para el sistema de extrusión.

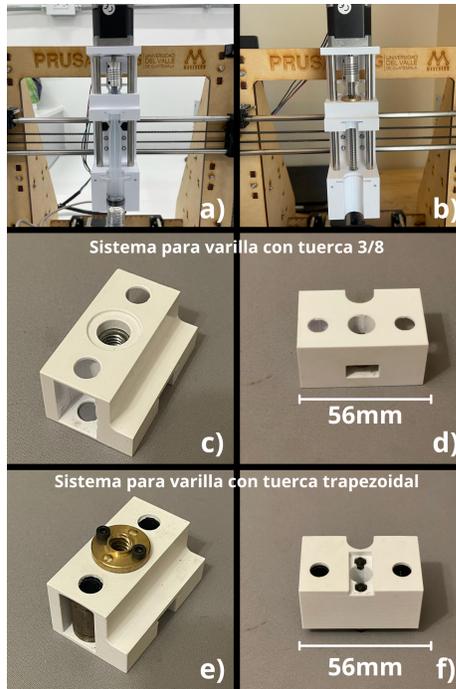


Figura 19: Sistemas implementados en la bioimpresora con el sistema de cojinetes en las dos versiones.

8.3. Calibración

Para determinar si el sistema de extrusión con varilla roscada de acero inoxidable con tuerca 3/8 extruye correctamente se ajustó el Feedrate (step/mm) con un valor de E7000 en el Firmware Marlin, correspondiente a 1 mL/pasos. Se obtuvo un promediado de extrusión de agua ultra pura de $0.9954 \text{ ml} \pm 0.46 \%$, $0.9972 \text{ ml} \pm 0.28 \%$, y $0.9880 \text{ ml} \pm 1.2 \%$, para $10 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$, $20 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ y $30 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ respectivamente, donde se observó que para la velocidad de $10 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ los datos están sesgados a la izquierda, para $20 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ y $30 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ muestran una distribución normal aunque se muestra un punto atípico para la velocidad de $30 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ (Figura 20a).

Como segunda prueba se programó dispensar 3 ml a las mismas tres velocidades, promediando una extrusión de agua ultra pura de $3.008 \text{ ml} \pm 0.27 \%$, $2.999 \text{ ml} \pm 0.03 \%$ y $2.9922 \text{ ml} \pm 0.27 \%$, mostrando que para la velocidad de $10 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ la distribución se comporta de manera normal aunque hay valores atípicos en ambos extremos, para $20 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ hay un sesgo a la izquierda lo que indica que los valores de extrusión están por debajo de 3 ml y para $30 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ los valores están muy concentrados, se infiere por tener una caja pequeña (Figura 20b).

Por último, se programó dispensar 5ml a las mismas condiciones que las pruebas anteriores, promediando una extrusión de agua ultra pura de $4.9854 \text{ ml} \pm 0.29 \%$, $4.9658 \text{ ml} \pm 0.68 \%$ y $4.9772 \text{ ml} \pm 0.46 \%$, en el cual para la velocidad de $10 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ obtuvo una caja muy grande, lo que indica que los datos están separados uno del otro, para $20 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ se observó un sesgo hacia la izquierda mientras que para $30 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ se mostró una distribución normal (Figura 20c).

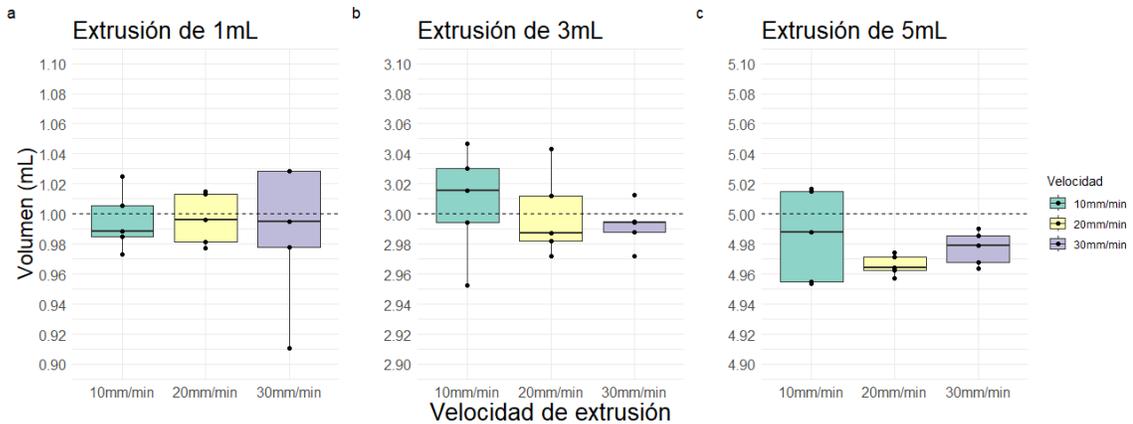


Figura 20: Resultados de variabilidad en la extrusión de 7000 pasos por ml.

De igual manera que el sistema de extrusión anterior, se determinó si el sistema de extrusión con varilla roscada de 8 mm con tuerca trapezoidal T8 extruye correctamente por lo que se colocó un valor de Feedrate (step/mm) de E1400 en el Firmware Marlin, corresponde a los pasos requeridos para extruir 1 ml. Para la primer prueba, se programó dispensar 1 ml obteniendo una extrusión de agua de $0.9915 \text{ ml} \pm 0.85 \%$, $1.0126 \text{ ml} \pm 1.26 \%$ y $0.9834 \text{ ml} \pm 1.66 \%$, para $10 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$, $20 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ y $30 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ respectivamente, mostrando que para la velocidad $10 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ los valores no están dispersos y se concentran por debajo de 1 ml. Para la velocidad de $20 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ mostró un sesgo a la izquierda y tiene puntos atípicos en 1.06 ml. Por último, para la velocidad de $30 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$, muestra una distribución normal pero con puntos atípicos que están muy alejados de los valores dentro de la caja (Figura 21a).

Como segunda prueba se programó dispensar 3 ml a las mismas tres velocidades, promediando una extrusión de agua de $2.9899 \text{ ml} \pm 0.03 \%$, $3.0007 \text{ ml} \pm 0.02 \%$ y $2.9807 \text{ ml} \pm 0.64 \%$, donde se observó que para la velocidad de $10 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ su distribución se encuentra sesgada a la derecha, lo cual significa que hay más valores por encima del promedio, para $20 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ se muestra un sesgo a la izquierda y para $30 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ los valores están sesgados a la derecha (Figura 21b).

Por último, se solicitó dispensar 5 ml a las mismas condiciones que las pruebas anteriores, promediando una extrusión de agua de $4.9868 \text{ ml} \pm 0.26 \%$, $4.9634 \text{ ml} \pm 0.72 \%$ y $4.9864 \text{ ml} \pm 0.27 \%$, dando como resultado en que la velocidad de $10 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ obtuvo valores sesgados a la izquierda, para $20 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ donde se observó una distribución normal pero con valores muy dispersos y para $30 \frac{\text{mm}}{\text{min}}$ se mostró una distribución normal con valores atípicos (Figura 21c).

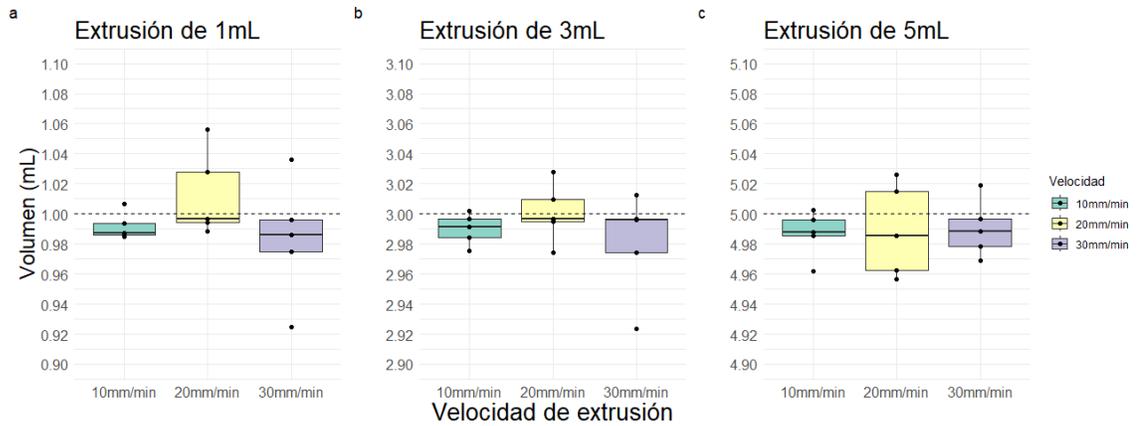


Figura 21: Resultados de variabilidad en la extrusión de 1400 pasos por ml.

8.4. Parametrización de la bioimpresora 3D

8.4.1. Prueba de parametrización

Durante la prueba de parametrización a mano alzada, se observó que a medida que la concentración de CaCl_2 y del Alginato de Sodio aumentaban, la rigidez de las líneas incrementaba (Figura 22). Al realizar las pruebas con las diferentes boquillas (G18, G20, G22 y G25), no se observó un cambio significativo en el grosor de la línea del hidrogel, ya que la presión no era constante ni uniforme.



Figura 22: Parametrización del hidrogel y CaCl_2 a distintas concentraciones con diferentes boquillas.

8.4.2. Parametrización de impresión 3D

Las líneas de impresión, en el modelo de Inventor Autodesk tienen un grosor de 0.9 mm mientras que la separación entre cada una de ellas es de 4 mm (Figura 15a). A medida de que la concentración de alginato de sodio aumenta, las distancias medidas por el estereoscopio se asemejan a las del modelo digital. Para una concentración de alginato de sodio al 2 % el grosor de las líneas llegaron a medir más de 2 mm y la separación entre líneas entre 2.81 mm - 2.87 mm (Figura 23a). Al imprimir el objeto con alginato de sodio al 3 %, obtuvieron un grosor de las líneas entre 1.95 mm - 2.16 mm y una separación entre 2.88 mm - 3.00 mm (Figura 23b).

Las dimensiones se redujeron considerablemente al utilizar alginato de sodio al 5 %, obteniendo que las líneas tuvieran un grosor entre 0.84 mm - 0,94 mm y una separación entre 3.79 mm - 3.89 mm (Figura 23c). Por último, con el alginato de sodio al 8 % aumentaron las dimensiones respecto al alginato de sodio al 5 % pero no sobrepasaron las dimensiones que se imprimieron con alginato de sodio al 2 % y 3 %. Asimismo, se observó que formaron grumos, generando imperfecciones durante la impresión, haciendo que en ciertos tramos haya más material de lo debido (Figura 23d).

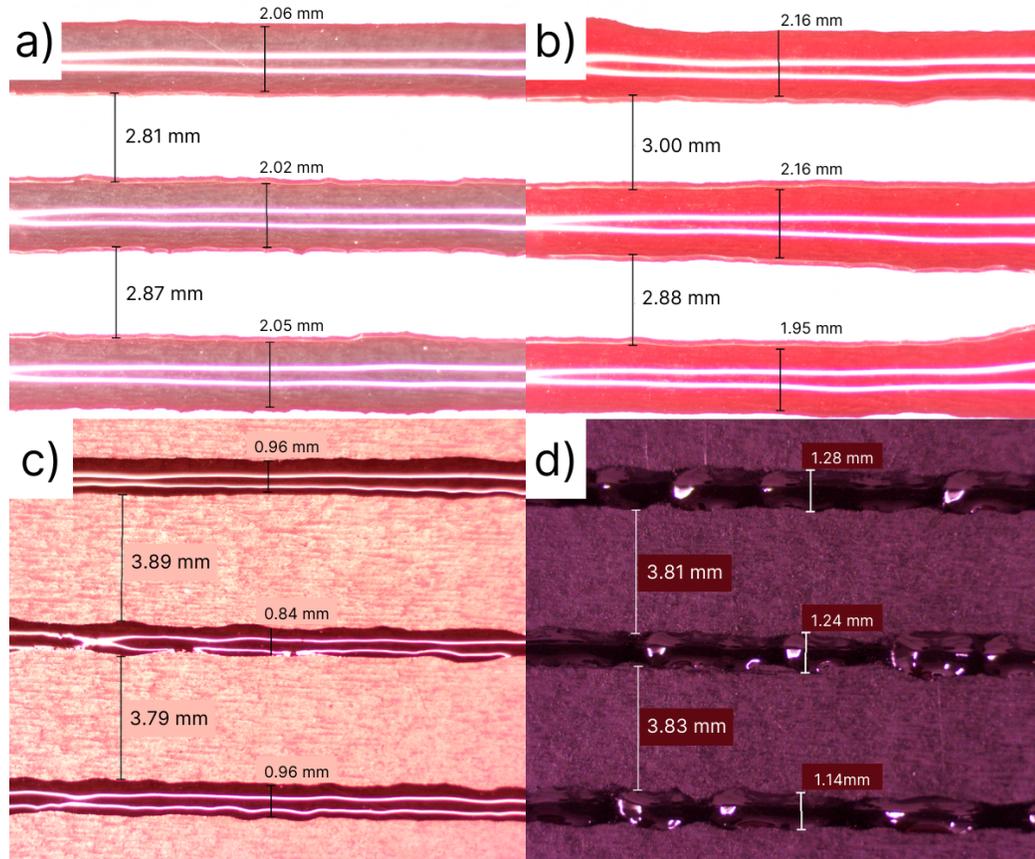


Figura 23: Mediciones del grosor y distancia entre cada línea impresa. a) Alginato de Sodio al 2%, b) 3%, c) 5% y d) 8%.

La onda senoidal que se diseñó en Inventor Autodesk tiene un grosor de línea de 0.9 mm, una longitud de 77 mm y un ancho de 20 mm. Se observó que al emplear alginato de sodio al 5%, las mediciones de longitud y ancho exhiben similitudes, sin embargo, es notable que el grosor del diseño impreso difiere de tener que medir 0.9 mm a medir 1.42 mm teniendo un 57% más de grosor con respecto al valor del modelo digital (Figura 24).

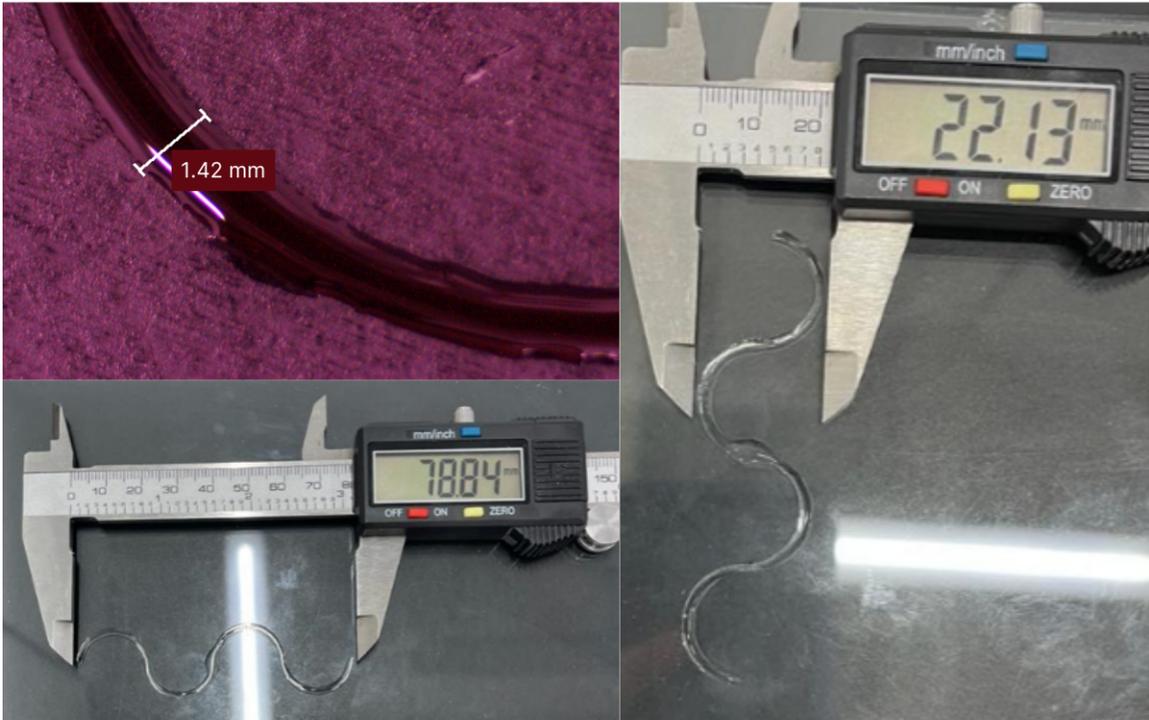


Figura 24: Mediciones del grosor, largo y ancho del diseño en forma de onda senoidal con regla Bernier y el estereoscopio.

8.4.3. Prueba de impresión con boquilla G18 y G20

Previo a realizar las pruebas de impresión se observó el comportamiento del alginato de sodio el método A, consistió en sumergir el alginato de sodio en un recipiente con cloruro de calcio (CaCl_2), en el cual se mostró que al ser extruido directamente en el recipiente, el alginato de sodio no se adhiere y no mantiene su estructura, únicamente formó líneas sin patrón alguno (Figura 25). El método B, se utilizó una jeringa con cloruro de calcio (CaCl_2), que se agregó directamente luego de culminada la impresión, cubriendo toda su superficie por completo y dejándola actuar por unos minutos. El resultado de aplicar directamente el cloruro de calcio (CaCl_2) mostró que la estructura reduce sus dimensiones, pero mantiene una estructura sólida, maleable y viscosa (Figura 27, 28 y 29).

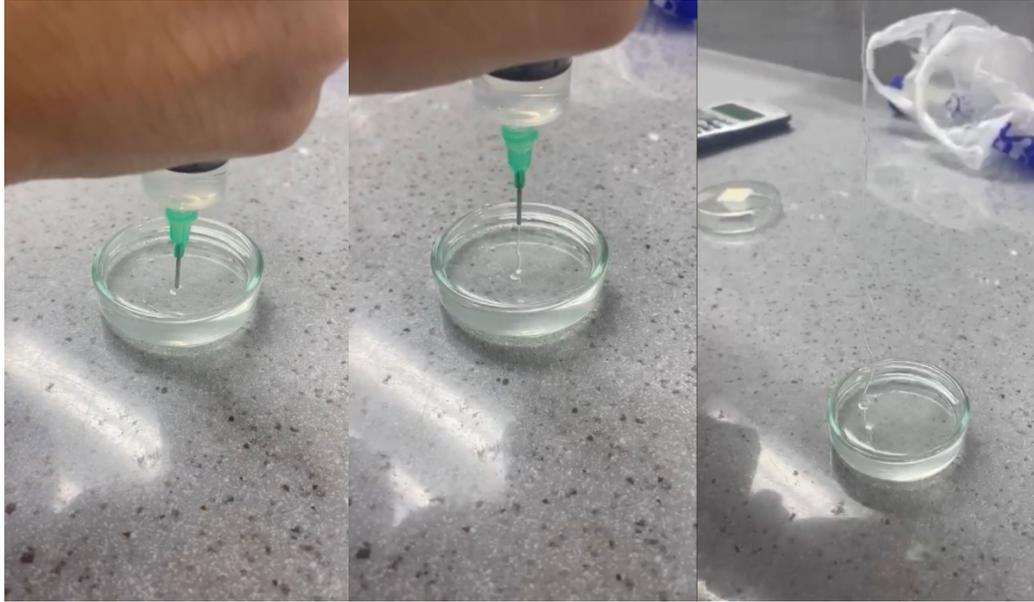


Figura 25: Interacción del alginato de sodio con el cloruro de calcio en una caja de petri.

Durante las pruebas de impresión 2D donde se busca imprimir cuadrados de 50x50 mm, al variar los porcentajes de Infill, se pudo observar una clara influencia en la densidad de la impresión. Utilizar valores por debajo del 50 % del Infill conlleva a pérdida de resolución en las estructuras, sobre todo en las esquinas y el perímetro del cuadrado (Figura 26a). Asimismo, se pudo determinar que el incrementar el Infill del 15 % al 50 % mejoraba lentamente la calidad del resultado, pero aún se podían observar imperfecciones como espacios vacíos (Figura 26b).

Al aumentar el Infill de 50 % a 75 % se observó una mejoría en la impresión, pero aún tenía errores de impresión en el perímetro de la estructura (Figura 26c), al cambiar el Infill a 100 % se observó que la densidad de la impresión aumentó, sin embargo, el patrón de impresión "Lineal" produce imperfecciones al inicio de la impresión (Figura 26d) dejando espacios sin rellenar por parte del hidrogel.

Por último, se cambió el patrón de impresión a "ZigZag", donde se pudo observar una clara influencia en el tipo de patrón de impresión, mejorando la calidad del diseño final (Figura 26e), para asegurar de que los últimos parámetros establecidos fueran válidos, se imprimió una vez más, logrando imprimir de la misma manera el objeto (Figura 26f).

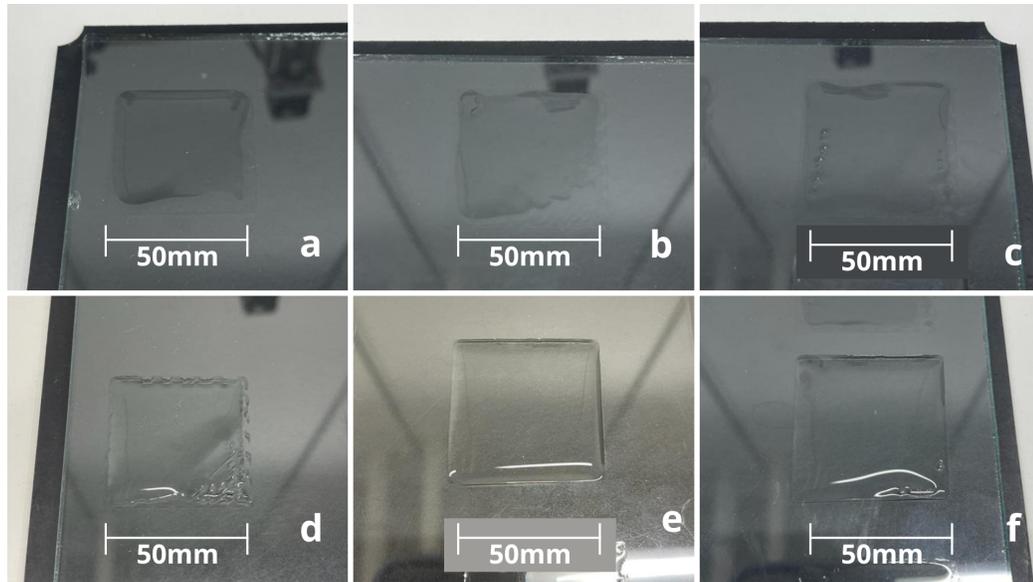


Figura 26: Modificando parámetros de Infill a) 15 %, b) 50 %, c) 75 %, d) 100 % y de Top/Bottom Pattern a-d) Lineal y e-f) ZigZag.

Durante el proceso de impresión de los seis objetos cuadrados de 50x50 mm, la forma de agregar el cloruro de calcio (CaCl_2) a las impresiones se llevó a cabo usando una jeringa con el reticulante, que se esparcía por todo el objeto impreso. En el transcurso de este procedimiento, las impresiones experimentaron deformaciones que resultaron en una contracción y reducción de su tamaño, pasando de medidas de 50x50 mm a medir entre 40x40 mm y 35x35 mm (Figura 27). El objeto con una deformación más notoria fue el compuesto por 2% de Alginato de Sodio y 450 mM de CaCl_2 , donde se desbordó, perdiendo su estructura inicial y llegando a medir 60x35 mm. Todos las impresiones obtuvieron dobleces de sus esquinas, mientras que el objeto que menos se redujo de tamaño fue el compuesto por 3% de Alginato de Sodio y 1.35M de CaCl_2 . Los tiempos de impresión de cada uno de los objetos duró menos de un minuto debido a que su estructura no es compleja.

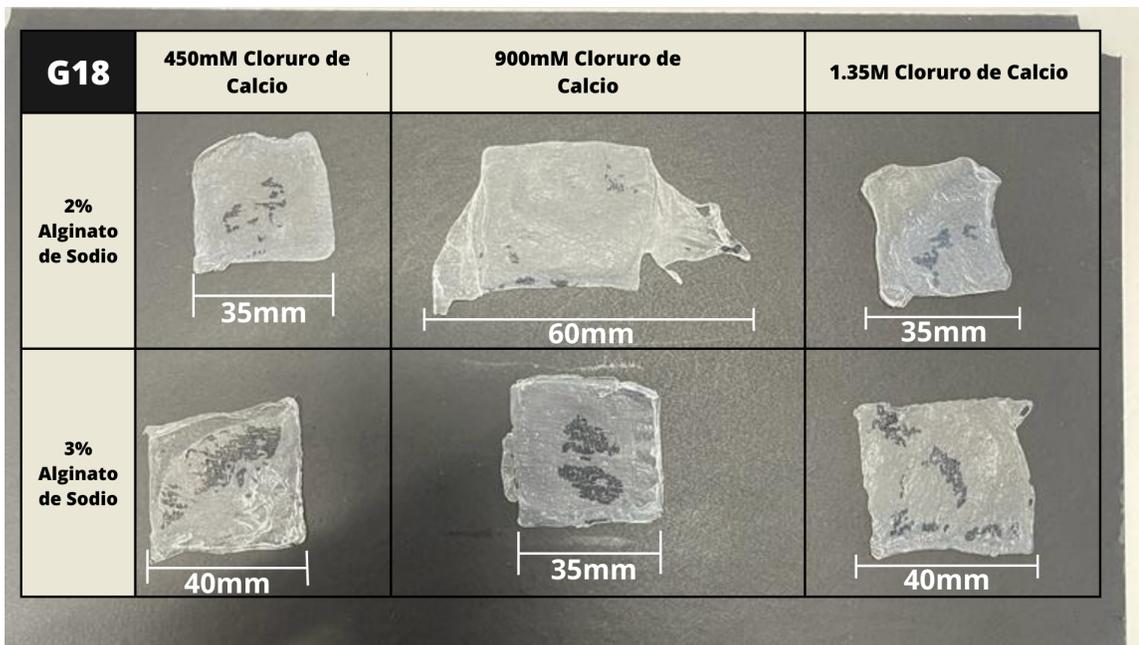


Figura 27: Hidrogeles impresos con boquilla G18 luego de la reticulación de CaCl_2 a distintas concentraciones (450 mM, 900 mM y 1.35 M) y Alginato de Sodio a distintas concentraciones (2% y 3%).

Para las pruebas con la boquilla G20 se utilizaron dos formas distintas, un cuadrado 50x50 mm y un hexágono que de vértice a vértice mide 40 mm, luego de agregar el reticulante (CaCl_2) las dimensiones del cuadrado se redujeron 15 mm, llegando a medir 35 mm de cada lado, mientras que el hexágono redujo su tamaño a 30 mm de vértice a vértice. Se observó un doblez presente en todas los cuadrados impresos aunque mantienen de mejor manera su estructura original, a su vez se observó que el hexágono compuesto por 3% de Alginato de Sodio y 1.35M de CaCl_2 se volvió más opaco (Figura 28).

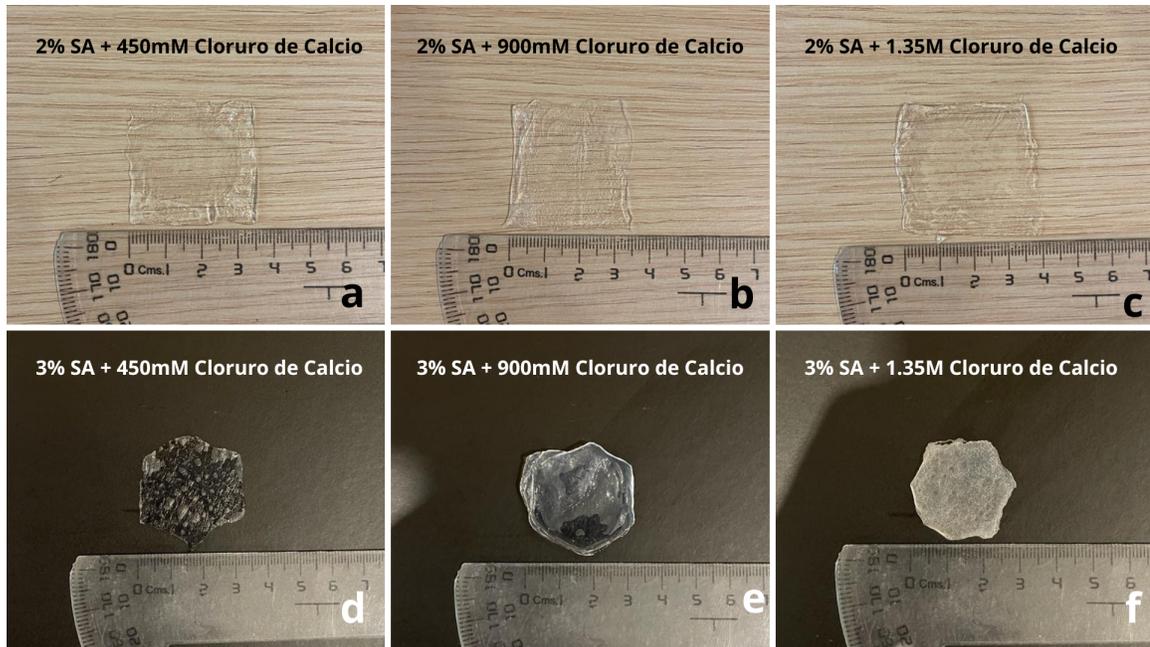


Figura 28: Hidrogeles impresos con boquilla G20 luego de la reticulación de CaCl_2 a distintas concentraciones (450 mM, 900 mM y 1.35 M) y Alginato de Sodio a distintas concentraciones (2% y 3%).

8.4.4. Prueba de impresión con Alginato de Sodio al 5% y 8%

Por último, se imprimieron 6 objetos cuadrados de 40x40x0.5 mm usando la boquilla G18, en los cuales se agregó el CaCl_2 directamente al objeto, haciendo que se redujeran las dimensiones aproximadamente 10 mm para cada una de las pruebas. Se observó, que para todos los cuadrados impresos se generaron dobleces en sus esquinas, sin embargo, el objeto con menos deformación fue diseñado con alginato de sodio al 5% con 450 mM CaCl_2 . Los cuadrados impresos con alginato de sodio al 8% con 900mM CaCl_2 y 1.35 M CaCl_2 no lograron formar correctamente el cuadrado, incluso a la hora de imprimir se generaron grumos que impedían la extrusión de más material (Figura 29).

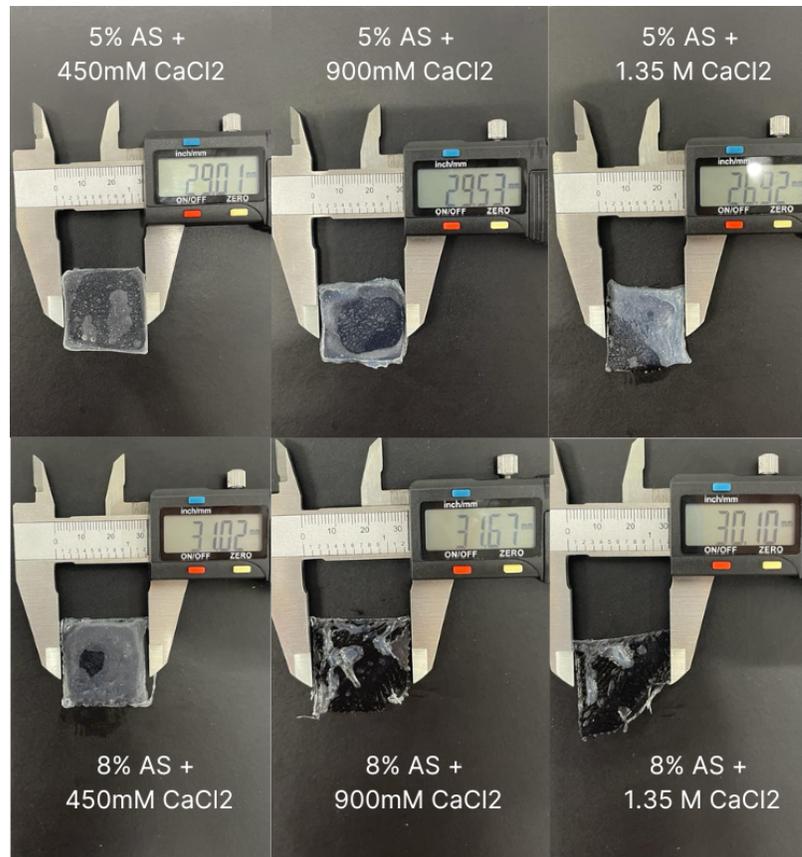


Figura 29: Hidrogeles impresos con boquilla G18 luego de la reticulación de CaCl₂ a distintas concentraciones (450 mM, 900 mM y 1.35 M) y Alginato de Sodio a distintas concentraciones (5% y 8%).

Las modificaciones realizadas al firmware y hardware de la impresora 3D fueron adecuadas para permitir la impresión de modelos simples en 2D utilizando un hidrogel a temperatura ambiente, sin causar ninguna alarma o error en el software de impresión. Sin embargo, se tuvo que probar diferentes valores de Feedrate del extrusor para poder extraer lo equivalente a 1 ml modificando el comando M92 que está asociado a los step/mm de la impresora. De igual manera los resultados obtenidos al crear el G-code de inicio y final fueron precisos y cumplieron con su función, de permitir imprimir objetos sin lastimar o deformar la estructura ya impresa.

Los resultados de la primera versión y de la segunda versión del sistema de extrusión no fueron los esperados debido a que se tuvieron fallos de diseño (Figura 18a-c) y no se percató de las especificaciones de impresión de la impresora del Makerlab, lugar donde se mando a imprimir los sistemas de extrusión. En la segunda versión del sistema de extrusión se consideró que la calibración de la cama de impresión se haría manual, con el fin de evitar que el BLTouch entre en contacto con la caja de petri y pueda dañar la impresión y la jeringa (Figura 18d-f). Otro cambio importante a cambiar fue la ubicación del sistema de anclaje ya que se observó de un movimiento oscilante en la parte superior donde se ubica el motor stepper, esto debido al peso tan grande que tiene el motor.

Para la tercera versión y última para este proyecto, se redimensionó la circunferencia del orificio para las varillas lisas a 8.2 mm, ya que son 0.2 mm de precisión que tiene la impresora del Makerlab 45, para que las piezas casen perfectamente sin causar movimientos no deseados. Además, se modificó la ubicación del sistema de anclaje por encima del soporte que sostiene la parte inferior de la jeringa y se eliminó el soporte para el sensor BLTouch (Figura 18g-i). Las impresiones mejoraron ya que el sistema no produjo ningún movimiento brusco. Asimismo, se diseñó dos sistemas para el soporte de los cojinetes, el primero para una varilla roscada de acero inoxidable con tuerca de 3/8 (Figura 19c-d) y la segunda se diseñó para adaptarse a una varilla roscada de 8 mm con una tuerca trapezoidal T8 (Figura

19,e-f).

Se realizaron pruebas de extrusión para determinar la cantidad de pasos que debe de realizar el motor stepper para extruir 1 ml, debido a que el motor stepper esta programado para extruir 1 mm de filamento; su valor predeterminado estaba en 837 pasos/mm, por lo que se fue modificando el parámetro del firmware Marlin (DEFAULT_AXIS_STEPS_PER_UNIT) de tal manera que extruyera 1 ml.

Se comprobó que el diseño con tuerca trapezoidal T8 requiere menos movimientos (1400 step/ml), mientras que la varilla con tuerca 3/8 requiere un mayor movimiento (7000 step/ml), haciendo que el esfuerzo del motor sea mayor y el tiempo de impresión aumente, este último aspecto no afecta considerablemente debido a que no se imprimieron piezas complejas. El sistema con tuerca trapezoidal T8 se seleccionó para seguir con los demás experimentos, ya que requiere de menos pasos para extruir 1 ml y según las gráficas de caja y bigotes (Figura 20 y Figura 21), mostró menos variaciones a la hora de cambiar las velocidades de impresión y el que mantuvo en promedio de extrusión más preciso 1.0015 ml \pm 0.56 % por 1 ml programado frente a los 0.9935 ml \pm 0.33 % por 1 ml programado del sistema de extrusión con varilla roscada de 3/8.

Luego de completar las modificaciones de hardware y software de la bioimpresora, se observó que entre más concentrado sea el hidrogel más viscoso es el mismo 43. Mientras que para la síntesis del cloruro de calcio (CaCl_2), se esperaba que la formación del reticulante fuera espeso, similar al FRESH LifeSupport™ Powder utilizado como reticulante para bioimpresión 3D 46. Sin embargo, el resultado fue de una consistencia líquido similar al del agua, la causa de esto se debe a que el cloruro de calcio CaCl_2 empleado en el proyecto fue de grado alimenticio, mientras que el espereado es de grado reactivo para laboratorio.

Para validar el funcionamiento del reticulante se probaron dos métodos de reticulación. El método A, el cual no se implementó ya que no formaba ninguna estructura concisa (Figura 25), debido a que el cloruro de calcio al ser muy líquido no podía sostener y dejar en una posición fija al alginato de sodio que era extruido. Mientras que el método B, se probó a 450 mM de cloruro de calcio (CaCl_2) con alginato de sodio al 2 %, mostrando buenos resultados formando un hidrogel sólido capaz de ser maleable sin perder su conformación original y poder ejercer fuerzas leves sin romperse, el método B se seleccionó como el método para la reticulación entre el alginato de sodio y cloruro de calcio (CaCl_2).

Durante la prueba de parametrización (Figura 22), se observó que a medida que aumentaba la concentración del alginato de sodio y el cloruro de calcio (CaCl_2) los objetos obtenían propiedades mecánicas cada vez mayores, aumentando su dureza y resistencia a la tensión. Esto se debe a que el alginato de sodio al ser un biopolímero que reacciona con los cationes de calcio (Ca^{2+}) crean una reacción formando puentes iónicos con las cadenas del alginato de sodio, entrelazándose permitiendo formar una estructura más sólida, por lo que al aumentar la concentración de cloruro de calcio (CaCl_2) aumentando los cationes de calcio (Ca^{2+}), haciendo que se formen más puentes iónicos y por consiguiente el hidrogel confiere una estructura más rígida y compacta, ya que las cadenas poliméricas están más juntas 39. De tal forma que las dimensiones del objeto impreso redujeron su tamaño 10 mm aproximadamente para cada objeto impreso en el proyecto.

En el software de Cura Lulzbot se diseñaron perfiles específicos para cada tipo de boqui-

lla, ya que dentro del software hay un apartado para seleccionar el tamaño de la boquilla, asimismo para el tamaño de la jeringa a utilizar; se debe de colocar el diámetro interno de la jeringa. Se coloca el diámetro interno de la jeringa ya es el émbolo el que se estará moviendo para extruir el hidrogel y no el cilindro. En este caso, se utilizó una jeringa de 20 ml con un diámetro interno de 18.65 mm, además en el parámetro de Layer Height se colocó el 40 % del valor del diámetro interno de la boquilla a utilizar, en el caso de una boquilla G18 con un diámetro interno de 0.84 mm queda con un Layer Height de 0.34 mm esto se debe a que entre la boquilla y la cama de impresión se debe de dejar un espacio libre para que al momento de extruir el hidrogel salga a presión constante sin que se atasque el hidrogel y pueda imprimir correctamente. Para ello se realizaron pruebas de impresión usando la boquilla G18, modificando parámetros como el Infill, Flow, Initial Layer Flow Rate y Top/Bottom Pattern.

Los parámetros de Infill, Flow, Initial Layer Flow Rate y Top/Bottom Pattern además de los parámetros específicos para cada perfil de boquilla como el diámetro, la altura de la capa y el espesor de la pared (Anexos cuadros, 6,7,8) fueron modificados debido a que estos parámetros son modificables dentro de Cura Lulzbot. Los cuales al ser modificados mostraron cambios significativos. Al aumentar el Infill se notó un incremento en la cantidad de hidrogel extruido para rellenar el objeto. Se notaron mejoras al cambiar el parámetro Top/Bottom Pattern de Lineal a ZigZag, al realizarse este cambio, el patrón ZigZag creó una nueva línea de impresión a partir del último punto registrado (Figura 30b), mientras que el patrón Lineal produjo un salto hasta el otro lado del diseño (Figura 30a), perjudicando a la impresión ya que la boquilla al pasar por todo el objeto, se llevaba consigo partes de la impresión.

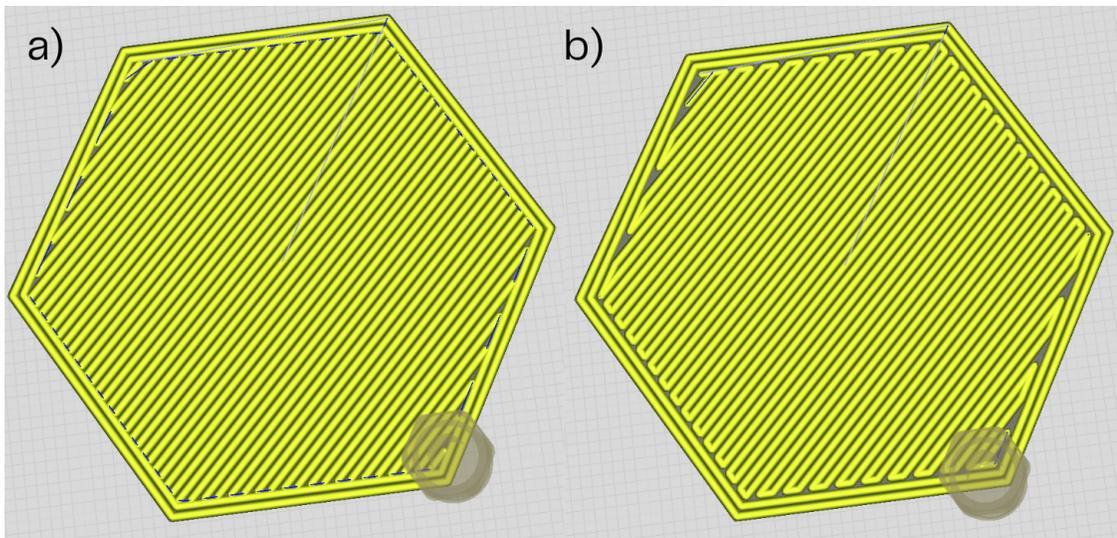


Figura 30: a) Top/Bottom Pattern: Lineal y b) Top/Bottom Pattern: ZigZag.

Los resultados de las impresiones usando la boquilla G18 y G20, fueron prometedores ya que generaron objetos 2D simples, imprimiendo objetos a distintas concentraciones tanto del reticulante como alginato de sodio. Se observó que al aumentar la concentración de alginato de sodio, mejora su adherencia con la cama de impresión evitando desbordamientos y generando líneas más precisas con respecto al modelo digital (Figura 23). Tal fue el caso para las pruebas de las 3 líneas impresas, mostrando que a medida que la concentración

aumenta el grosor de las líneas y separación entre ellas se acercaba más a 0.9 mm y 4 mm respectivamente. Sin embargo, se notó que la concentración de 8 % de alginato de sodio, al ser la más alta, se pensaría que sería la mejor opción para elegirla como hidrogel estándar, pero se generan grumos que alteran a la impresión. Por lo tanto, una buena opción de hidrogel sería el alginato de sodio al 5 % con 900 mM de cloruro de calcio (CaCl_2), ya que las impresiones con estas concentraciones formaron objetos maleables y sin deformaciones graves durante todas las pruebas de impresión.

- Se diseñó e implementó un sistema de extrusión con la capacidad de dispensar con precisión y controlando la deposición del hidrogel de alginato de sodio. El sistema de extrusión se diseñó para que por cada mililitro programado, entregue $1.0015 \text{ ml} \pm 0.56 \%$.
- El sistema de extrusión diseñado para la varilla roscado de 8 mm con tuerca trapezoidal presentó el mejor desempeño al momento de dispensar el hidrogel de alginato de sodio y generar objetos en 2D.
- Se elaboró un código G-code capaz de ejecutar órdenes específicas diseñadas para una bioimpresora 3D al inicio y finalización de cada impresión.
- Se crearon perfiles específicos para cada tipo de boquilla, determinando los parámetros relevantes para la impresión de objetos.
- El proceso de reticulación donde se utiliza cloruro de calcio (CaCl_2) agregado directamente a la pieza terminada la impresión, no es el más óptimo. A pesar de esto, ha sido el único método que ha demostrado ser funcional.
- A medida que la concentración del hidrogel aumenta, la estructura muestra una mayor rigidez, indicando una relación directa entre la concentración y las propiedades mecánicas del objeto impreso. Asimismo para la elección de una boquilla, a medida que el valor del diámetro se reduce, mejora la resolución de impresión permitiendo imprimir líneas más delgadas. Sin embargo, para estos dos casos se requiere de una mayor presión para poder extruir el hidrogel.
- Las impresiones con mejores resultados fueron aquellas impresas a una velocidad de 23 mm/s con la boquilla G18, el hidrogel de alginato de sodio al 5% y el reticulante de CaCl_2 a 900 mM, debido a que sus estructuras permitieron estirarlas con gran fuerza sin llegar a romperse.

- Se recomienda buscar productos químicos diseñados específicamente para bioimpresión 3D. Hacer pruebas con un nuevo cloruro de calcio CaCl_2 , se sugiere trabajar con el producto de FluidForm, el FRESH Lifesupport Powder, formulado especialmente para bioimpresión, permitiendo explorar la viabilidad de imprimir estructuras tridimensionales con la bioimpresora.
- Se sugiere realizar una investigación exhaustiva sobre diversos mecanismos de extrusión aplicables a bioimpresoras por extrusión de tinta, de tal manera de modificar el sistema de extrusión para que pueda extruir hidrogeles con concentraciones altas, y formar objetos tridimensionales de mejor calidad.
- Para futuros avances, se recomienda crear un sistema de esterilización, ya que las bioimpresoras 3D requieren de un entorno limpio y estéril para que las células dentro del biomaterial puedan reproducirse y crecer con normalidad. A esto, se recomienda tener equipo externo de incubación con control de temperatura específico para cultivos.
- Se recomienda comenzar hacer pruebas de viabilidad celular, por lo que al utilizar el conjunto de jeringa - boquilla, se descarten luego de su uso, para no afectar en el resultado de impresiones con distintos tipos de células o biomateriales.
- Se recomienda diseñar un soporte para ubicar las cajas de petri sujetándolas dentro de la cama de impresión con el fin de impedir algún movimiento y que afecte en la impresión del hidrogel.

-
-
- [1] L. G. Griffith y G. Naughton, “Tissue Engineering-Current Challenges and Expanding Opportunities,” *Science*, vol. 295, n.º 5557, págs. 1009-1014, 2002. DOI: [10.1126/science.1069210](https://doi.org/10.1126/science.1069210).
 - [2] D. J. Thomas, Z. M. Jessop e I. S. Whitaker, *3D bioprinting for reconstructive surgery: techniques and applications*. United Kingdom: Woodhead Publishing, 2017.
 - [3] A. Khademhosseini y G. Camci-Unal, *3D bioprinting in regenerative engineering: Principles and Applications*. United State of America: CRC Press, 2018.
 - [4] F. J. O’Brien, “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering,” *Materials Today*, vol. 14, págs. 88-95, 3 2011, ISSN: 1369-7021. DOI: [10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
 - [5] S. Roldán, C. Vargas, M. Mejía, J. Zapata y M. E. Moncada, *Ingeniería de Tejidos y Aplicaciones*. Colombia: Fondo Editorial ITM, 2016.
 - [6] *Corning Matribot Bioprinter Parameters*, 2021. dirección: <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-AN-648.pdf> (visitado 04-05-2023).
 - [7] Y. Wu, J. Fuh e I. Ozbolat, *3D Bioprinting in Tissue and Organ Regeneration*. United State of America: Academic Press, 2022.
 - [8] M. Dipaola, *3D printing in orthopaedic surgery*. United State of America: Elsevier Health Sciences, 2018.
 - [9] A. Sanz-Garcia, E. Sodupe-Ortega, A. Pernía-Espinoza, T. Shimizu y C. Escobedo-Lucea, “A versatile open-source printhead for low-cost 3d microextrusion-based bioprinting,” *Polymers*, vol. 12, págs. 1-18, 10 oct. de 2020, ISSN: 20734360. DOI: [10.3390/polym12102346](https://doi.org/10.3390/polym12102346).
 - [10] M. Kahl, M. Gertig, P. Hoyer, O. Friedrich y D. F. Gilbert, “Ultra-low-cost 3D bioprinting: Modification and application of an off-the-shelf desktop 3D-printer for biofabrication,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, JUL 2019, ISSN: 22964185. DOI: [10.3389/fbioe.2019.00184](https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00184).

- [11] “Organización Panamericana de la Salud. Estrategia y Plan de Acción sobre Donación y Acceso Equitativo al Trasplante de Órganos, Tejidos y Células 2019-2030. 57° Consejo Directivo de la OPS, 71.a Sesión del Comité Regional de la OMS para las Américas, del 30 de septiembre al 4 de octubre de 2019; Washington, DC. Washington: OPS; 2019 (resolución CD57/11).” dirección: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51619/CD57-11-s.pdf?sequence=2&isAllowed=y> (visitado 02-05-2023).
- [12] B. Colop, C. Betancourt, J. Boj et al., “Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Registro Guatemalteco de Diálisis y Trasplante Renal Indicadores Básicos,” 2019. dirección: <https://epidemiologia.mspas.gob.gt/phocadownload/userupload/enfermedades-no-transmisibles/transplante-renal-GT-2019.pdf> (visitado 02-05-2023).
- [13] T. de P.L. Lima, C. A. d.A. Canelas, V. O. Concha, F. A. Costa y M. F. Passos, “3D Bioprinting Technology and Hydrogels Used in the Process,” *Journal of Functional Biomaterials*, vol. 13, 4 dic. de 2022, ISSN: 20794983. DOI: [10.3390/jfb13040214](https://doi.org/10.3390/jfb13040214).
- [14] F. Zhou, Y. Hong, R. Liang et al., “Rapid printing of bio-inspired 3D tissue constructs for skin regeneration,” *Biomaterials*, vol. 258, nov. de 2020, ISSN: 18785905. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2020.120287](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120287).
- [15] Ž. P. Kačarević, P. M. Rider, S. Alkildani et al., “An introduction to 3D bioprinting: Possibilities, challenges and future aspects,” *Materials*, vol. 11, 11 nov. de 2018, ISSN: 19961944. DOI: [10.3390/ma11112199](https://doi.org/10.3390/ma11112199).
- [16] J. W. Tashman, D. J. Shiwarski y A. W. Feinberg, “Development of a high-performance open-source 3D bioprinter,” *Scientific Reports*, vol. 12, 1 dic. de 2022, ISSN: 20452322. DOI: [10.1038/s41598-022-26809-4](https://doi.org/10.1038/s41598-022-26809-4).
- [17] N. Bessler, D. Ogiermann, M. B. Buchholz et al., “Nydus One Syringe Extruder (NOSE): A Prusa i3 3D printer conversion for bioprinting applications utilizing the FRESH-method,” *HardwareX*, vol. 6, oct. de 2019, ISSN: 24680672. DOI: [10.1016/j.ohx.2019.e00069](https://doi.org/10.1016/j.ohx.2019.e00069).
- [18] B. Yenilmez, M. Temirel, S. Knowlton, E. Lepowsky y S. Tasoglu, “Development and characterization of a low-cost 3D bioprinter,” *Bioprinting*, vol. 13, mar. de 2019, ISSN: 24058866. DOI: [10.1016/j.bprint.2019.e00044](https://doi.org/10.1016/j.bprint.2019.e00044).
- [19] M. S. Chapekar, “Tissue engineering: challenges and opportunities,” *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 53, n.º 6, págs. 617-620, 2000.
- [20] F. J. O’Brien, “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering,” *Materials Today*, vol. 14, págs. 88-95, 3 2011, ISSN: 13697021. DOI: [10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
- [21] S. J. Hollister, “Scaffold design and manufacturing: From concept to Clinic,” *Advanced Materials*, vol. 21, n.º 32–33, págs. 3330-3342, 2009. DOI: [10.1002/adma.200802977](https://doi.org/10.1002/adma.200802977).
- [22] Y. Xu, X. Wu, X. Guo et al., “The Boom in 3D-Printed Sensor Technology,” *Sensors (Basel, Switzerland)*, vol. 17, 5 mayo de 2017, ISSN: 14248220. DOI: [10.3390/s17051166](https://doi.org/10.3390/s17051166).

- [23] P. Lakkala, S. R. Munnangi, S. Bandari y M. Repka, “Additive manufacturing technologies with emphasis on stereolithography 3D printing in pharmaceutical and medical applications: A review,” *International Journal of Pharmaceutics: X*, vol. 5, dic. de 2023, ISSN: 25901567. DOI: [10.1016/j.ijpx.2023.100159](https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2023.100159).
- [24] F. M. Mwema y E. T. Akinlabi, “Basics of Fused Deposition Modelling (FDM),” *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*, págs. 1-15, 2020, ISSN: 21915318. DOI: [10.1007/978-3-030-48259-6_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-48259-6_1).
- [25] E. R. Kearns, R. Gillespie y D. M. D’Alessandro, “3D printing of metal-organic framework composite materials for clean energy and environmental applications,” *Journal of Materials Chemistry A*, vol. 9, págs. 27 252-27 270, 48 dic. de 2021, ISSN: 20507496. DOI: [10.1039/d1ta08777k](https://doi.org/10.1039/d1ta08777k).
- [26] E. Brandl, *Biología Sintética, Genética y Temas Avanzados*. Edenilson Brandl. dirección: https://books.google.com.gt/books?id=kN_FEAAAQBAJ.
- [27] O. Lowden, *What are the leading companies in 3D bioprinting industry?* Nov. de 2023. dirección: <https://blog.bccresearch.com/what-are-the-leading-companies-in-3d-bioprinting>.
- [28] A. Brandt, *Advancements of 3D Bioprinting: A market development study*, Master’s thesis, Available at <https://www.divaportal.org/smash/get/diva2:1768518/FULLTEXT01.pdf>, Sweden, jun. de 2023.
- [29] *BIO X, CELLINK A BICO COMPANY*, 2023. dirección: <https://www.cellink.com/bioprinting/bio-x-3d-bioprinter/> (visitado 04-05-2023).
- [30] *Allevi 1, 3D Systems*, 2023. dirección: <https://www.allevi3d.com/allevi-1/> (visitado 12-05-2023).
- [31] *Personaliza tu impresora BIO V1, REGEMAT*, 2023. dirección: <https://www.regemat3d.com/personaliza-tu-bioimpresora> (visitado 12-05-2023).
- [32] “Biological evaluation of medical devices,” ISO 10993-1:2018, Standard, 2018.
- [33] M. A. Lizarbe, “SUSTITUTIVOS DE TEJIDOS: DE LOS BIOMATERIALES A LA INGENIERÍA TISULAR,” *Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, vol. 101, págs. 227-249, 1 2007.
- [34] B. F. Nicolás, *Materiales Poliméricos en aplicaciones biomédicas*, Tesis de licenciatura, Available at <https://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/12464/tfg-fer-mat.pdf?sequence=1&isAllowed=y>, Colombia, jun. de 2023.
- [35] E. M. Ahmed, “Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review,” *Journal of Advanced Research*, vol. 6, págs. 105-121, 2 2015, ISSN: 20901232. DOI: [10.1016/j.jare.2013.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006).
- [36] A. S. Hoffman, “Hydrogels for Biomedical Applications.” dirección: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03823.x> (visitado 30-11-2023).
- [37] H. Samadian, H. Maleki, Z. Allahyari y M. Jaymand, *Natural polymers-based light-induced hydrogels: Promising biomaterials for biomedical applications*, oct. de 2020. DOI: [10.1016/j.ccr.2020.213432](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213432).
- [38] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin y F. Berthod, “Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications,” *Materials*, vol. 3, págs. 1863-1887, 3 2010, ISSN: 19961944. DOI: [10.3390/ma3031863](https://doi.org/10.3390/ma3031863).

- [39] C. C. Piras y D. K. Smith, “Multicomponent polysaccharide alginate-based bioinks,” sep. de 2020, págs. 8171-8188. DOI: [10.1039/d0tb01005g](https://doi.org/10.1039/d0tb01005g).
- [40] T. R. Senadheera, D. Dave y F. Shahidi, *Sea cucumber derived type i collagen: A comprehensive review*, sep. de 2020. DOI: [10.3390/md18090471](https://doi.org/10.3390/md18090471).
- [41] A. K. Bhatia, S. Dewangan y N. Vaidya, “Chapter 22 - Carbohydrates and derivatives as green corrosion inhibitors,” en *Computational Modelling and Simulations for Designing of Corrosion Inhibitors*, D. K. Verma, C. Verma y J. Aslam, eds., Elsevier, 2023, págs. 435-460, ISBN: 978-0-323-95161-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95161-6.00024-2>, dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323951616000242>.
- [42] M. Bahram, N. Mohseni y M. Moghtader, “An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications,” *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*, ago. de 2016. DOI: [10.5772/64301](https://doi.org/10.5772/64301).
- [43] E. Axpe y M. L. Oyen, *Applications of alginate-based bioinks in 3D bioprinting*, dic. de 2016. DOI: [10.3390/ijms17121976](https://doi.org/10.3390/ijms17121976).
- [44] *Ramps 1.4 Tarjeta De Control Para Impresora 3d*, 2023. dirección: <https://uelectronics.com/producto/ramps-1-4-tarjeta-de-control-para-impresora-3d/> (visitado 04-12-2023).
- [45] P. Mazariegos, *Especificaciones técnicas del servicio de impresión 3D*, 2023. dirección: <https://sites.google.com/uvg.edu.gt/makerlabuvg/?pli=1> (visitado 25-11-2023).
- [46] “LIFESUPPORT™ DIRECTIONS FOR USE SUPPORT BATH FOR FRESH™ 3D BIOPRINTING.” dirección: <https://www.cellink.com/wp-content/uploads/2022/03/FluidformDirectionsforUseVersion6-rev-Sep-2021.pdf>.

13.1. Dimensiones del sistema de extrusión final.

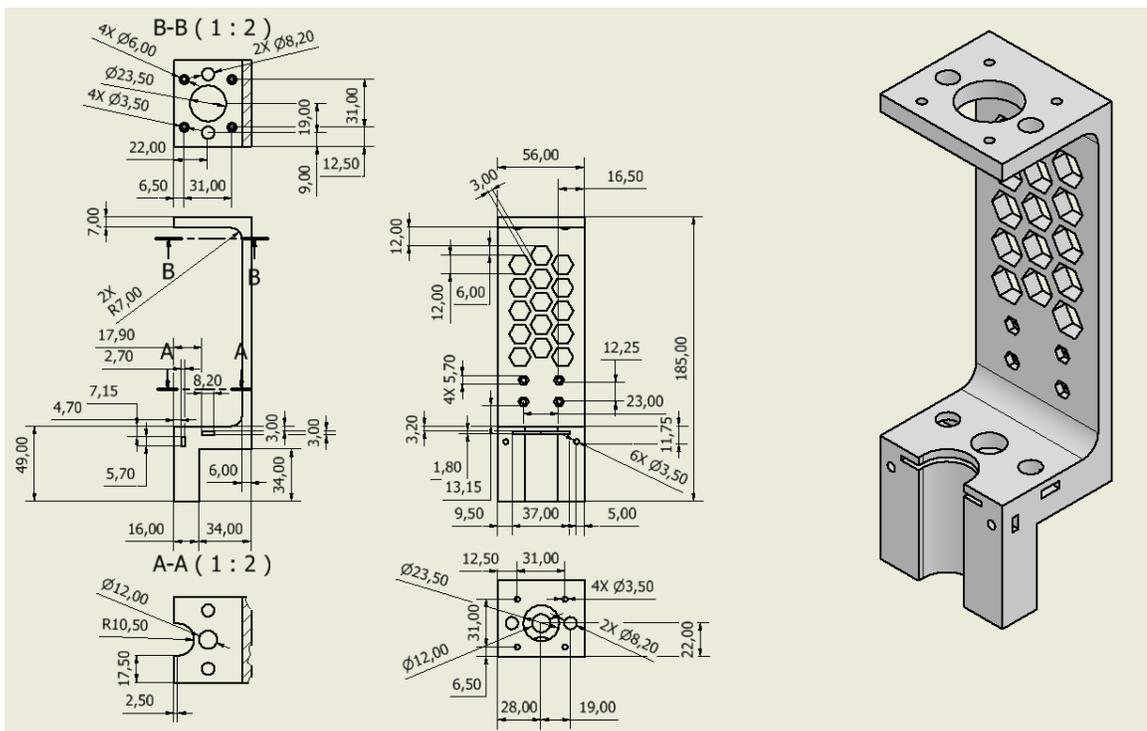


Figura 31: Dimensiones del sistema de extrusión final.

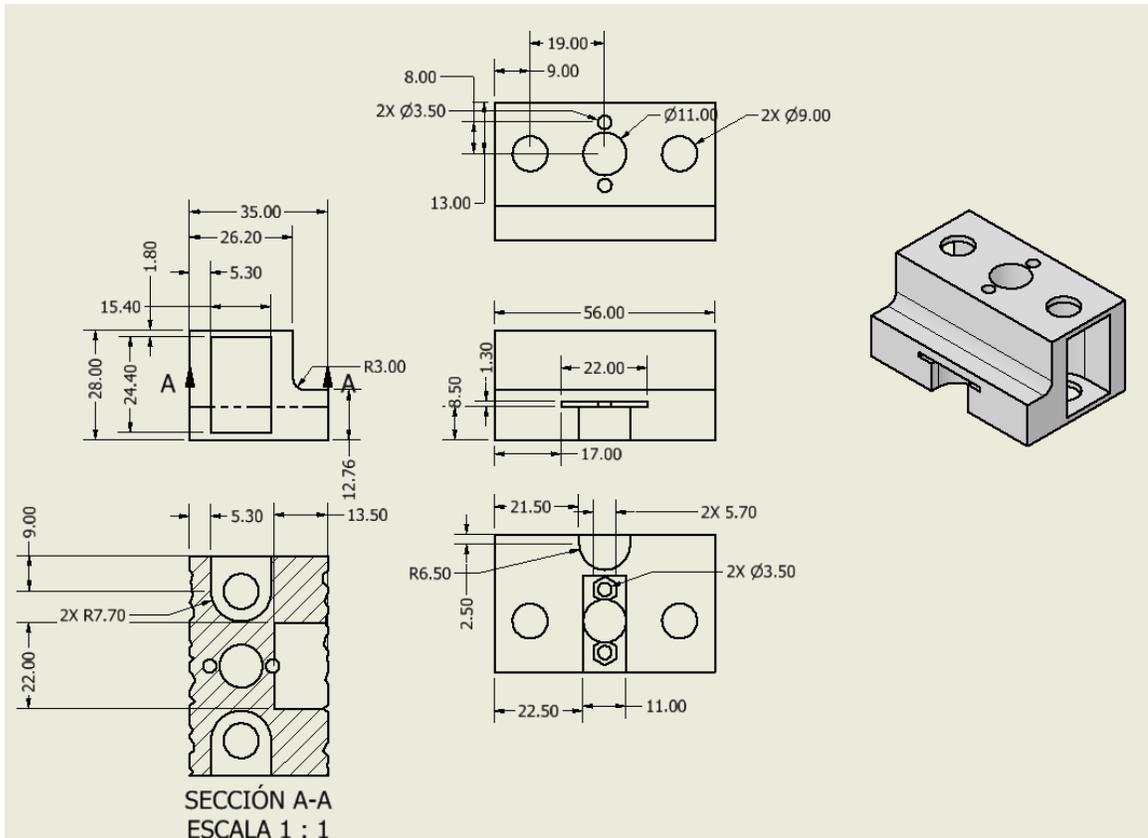


Figura 32: Dimensiones del sistema de soporte de cojinetes final para tuerca trapezoidal.

13.2. Creación de perfiles en Cura Lulzbot.

Needle Gauge	G18 0.84 mm	G20 0.60 mm	G25 0.26 mm
Syringe ID	18.65 mm		
Build Container Shape	Rectangular		
Build Container Dimensions X	162		
Build Container Dimensions Y	162		
Build Container Dimensions Z	180		
Infill %	100 %		
Infill Pattern	Grid		
Flow Rate	80 %		
Wall line Count	2		
Top/Bottom Pattern	Zig Zag		
Top Layers	2		
Bottom Layers	2		

Cuadro 5: Print Setup: Recommended.

Needle Gauge	G18 0.84 mm	G20 0.60 mm	G25 0.26 mm
Layer Height	0.34 mm	0.24 mm	0.104 mm
Initial Layer Height			
Line Width	0.84 mm	0.60 mm	0.26 mm
Wall Line Width			
Outer Wall Line Width			
Inner Wall Line Width			
Top/Bottom Line Width			
Infill Line Width			

Cuadro 6: Print Setup: Quality.

Needle Gauge	G18 0.84 mm	G20 0.60mm	G25 0.26 mm
Wall Thickness	1.68 mm	1.20 mm	0.52 mm
Wall Line Count	2		
Outer Wall Wipe Distance	0 mm		
Top/Bottom Thickness	0.680 mm	0.480 mm	0.208 mm
Top Thickness			
Top Layers	2		
Bottom Thickness	0.680 mm	0.480 mm	0.208 mm
Bottom Layers	2		
Top/Bottom Pattern	Lines		
Bottom Pattern Initial Layer	Lines		
Top/Bottom Line Directions	[]		
Outer Wall Inset	0 mm		0.29 mm
Outer Before Inner Walls	En blanco		
Alternate Extra Wall	En blanco		
Compesate Wall Overlaps	Check		
Compesate Outer Wall Overlaps	Check		
Compesate Inner Wall Overlaps	Check		
Fill Gaps Between Walls	Nowhere		
Horizontal Expansion	0mm		
Z sean Alignment	Shortest		
Ignore Small Z Gaps	Check		
Extra Skin Wall Count	0		

Cuadro 7: Print Setup: Shell.

Needle Gauge	G18 0.84 mm	G20 0.60 mm	G25 0.26 mm
Infill Density	100 %		
Infill Line Distance	1.733 mm		
Infill Pattern	Grid		
Infill Line Directions			
Infill Overlap Percentage	0 %		
Infill Overlap	0 mm		
Skin Overlap Percentage	0 %		
Infill Wipe Distance	0 mm		
Infill Layer Thickness	0.34 mm	0.24 mm	0.140 mm
Gradual Infill Steps	0		
Infill Before Walls	En blanco		
Minimum Infill Area	0		
Skin Expand Distance	0		

Cuadro 8: Print Setup: Infill.

