



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL  
PERÚ  
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA**

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA  
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA**

***Arquitectura metodológica para la evaluación  
sistemática y la optimización funcional de materiales  
en procesos de  
bioimpresión 3D mediante la tecnología CELLINK BIO-X***

Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Biomédico

que presenta:

***Lizardo Kendy Torres Ayala***

Asesor(es):

***Denis Helan Castillo Pareja***

Lima, 2025

**Jurado calificador**

**Presidente:** Mg. Domingo Vladimir Flores Robles

**Vocal:** Mg. Juan Manuel Zuñiga Mamani

**Secretario:** Mg. Noe Benjamin Bazan Lavanda

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	TORRES AYALA LIZARDO KENDY

Pertencientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOMÉDICA**, autores del trabajo titulado: **Arquitectura metodológica para la evaluación sistemática y la optimización funcional de materiales en procesos de bioimpresión 3D mediante la tecnología CELLINK BIO-X**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOMÉDICO** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	CASTILLO PAREJA DENIS HELAN	FACI	ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **4%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3447152263**; fecha de entrega: **17/12/2025**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 17 de diciembre de 2025**



---

Firma del asesor

N° DNI: 40219259

ORCID: 0000-0003-1010-2353

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, a mi hermano menor y a Madelein, por su apoyo incondicional y aliento constante, que incluso a la distancia dieron sentido y fortaleza a cada etapa de este trabajo.*

## AGRADECIMIENTOS

*A mi asesor, pilar fundamental en el desarrollo de la ingeniería biomédica en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, quien más que un mentor se convirtió en un amigo. Su apoyo constante, confianza y capacidad de gestión hicieron posible concretar esta tesis en tiempo récord. Su invitación a participar en este proyecto no solo permitió materializar este trabajo, sino que marcó un hito en mi formación personal y profesional.*

*A mis amigos de la universidad que me acompañaron en todo el proceso sin que las risas  
falten: Piero, Eduardo, Alvaro y Estiven.*

*A mis docentes de la rama de Biomateriales e Ingeniería de Tejidos de la PUCP y la UPCH: el Dr. Rolf Grieseler, la Dra. Suyeon Kim, la Dra. Fanny Casado, el Dr. Daniel Guerra, el Dr. Jose Espinoza y el Dr. Víctor Neyra, así como a los profesores de la Maestría en Ciencia e Ingeniería de Materiales-PUCP, cuyos conocimientos transmitidos y ejemplo académico han sido fundamentales para aprender a hacer ciencia y consolidar mi formación como investigador.*

# Índice general

Resumen .....	1
Abstract .....	2
I. Introducción .....	3
II. Pregunta de investigación, hipótesis y objetivos .....	4
2.1 Objetivos .....	5
2.2 Alcances y limitaciones.....	6
2.2.1 Estimación referencial de costos de materiales y consumibles.....	7
III. Marco teórico y estado de la cuestión .....	8
3.1 Biopolímeros empleados en bioimpresión por extrusión.....	8
3.1.1 Alginato de sodio .....	9
3.1.2 Gelatina .....	10
3.1.3 Goma xantana.....	10
3.1.4 Quitosano .....	10
3.1.5 Colágeno.....	11
3.1.6 Razonamiento para combinaciones estructurales.....	11
3.2 Propiedades estructurales requeridas por las tintas de biomaterial .....	12
3.2.1 Extrudabilidad y continuidad de flujo.....	14
3.2.2 Retención de forma y gelificación post-impresión .....	14
3.2.3 Evaluación combinada de fidelidad de fusión y circularidad .....	16
3.2.4 Estabilidad estructural frente a cargas gravitacionales .....	17
3.3 Justificación del uso de la plataforma CELLINK BIO-X en la caracterización funcional de biotintas .....	18
3.4 El modelo en V en la metodología VDI 2206.....	19
IV. Materiales y métodos .....	20
4.1 Materiales .....	21
4.2 Diseño de un toolbox funcional de hidrogeles híbridos para bioimpresión por extrusión .....	22
4.3 Caracterización de la capacidad de extrusión inicial de los hidrogeles mediante dispensación controlada manual .....	22
4.3.1 Preparación de las formulaciones para evaluación estructural.....	23
4.3.2 Evaluación preliminar de extrudabilidad mediante dispensación manual ..	23
4.4 Análisis del desempeño operativo de los hidrogeles seleccionados mediante la parametrización de velocidad y presión en la plataforma CELLINK BIO-X .....	24
4.5 Evaluación de la estabilidad estructural inmediata de los materiales bajo condiciones óptimas de impresión .....	25
4.5.1 Índice combinado de precisión y desempeño estructural.....	26
4.5.2 Evaluación del índice de colapso para estabilidad estructural inmediata ...	26
4.6 Validación final mediante impresión de un modelo anatómico complejo .....	27
V. Resultados .....	31

5.1 Identificación de requisitos y descomposición funcional del sistema.....	31
5.2 Clasificación funcional y generación del biomaterial-toolbox .....	32
5.3 Caracterización de la capacidad de extrusión inicial de los hidrogeles mediante dispensación controlada manual. ....	34
5.4 Análisis del desempeño operativo de los hidrogeles seleccionados mediante la parametrización de velocidad y presión en la plataforma CELLINK BIO-X .....	37
5.5 Evaluación de la estabilidad estructural inmediata .....	48
5.6 Evaluación del índice de colapso .....	51
5.7 Validación final mediante impresión de un modelo anatómico complejo .....	53
VI. Discusión.....	56
6.1 Recomendaciones para trabajos futuros .....	59
VII. Conclusiones.....	61
VIII. Referencias Bibliográficas .....	63
ANEXOS.....	72

## Resumen

La bioimpresión 3D surge como respuesta a la creciente demanda de soluciones para la escasez de órganos y la falta de modelos fisiológicos realistas en investigación biomédica. A nivel global, más de 110,000 pacientes esperan un trasplante cada año y, en el contexto peruano, la tasa de donación es de solo 1.6 por millón de habitantes. A pesar del avance del hardware, la estandarización de biotintas sigue rezagada: predominan enfoques empíricos y pruebas ad-hoc que limitan la reproducibilidad y dificultan su transición hacia aplicaciones clínicas.

Para abordar este vacío, esta tesis propone una **arquitectura metodológica sistemática** basada en la directriz VDI 2206 que permite evaluar el desempeño estructural de biotintas híbridas desde los parámetros operativos del propio sistema de impresión. Se diseñó un *toolbox* de hidrogeles (alginato, goma xantana, gelatina, quitosano y colágeno) evaluado mediante pruebas de extrudabilidad, fidelidad geométrica y estabilidad frente a colapso, integrando métricas como el índice de precisión relativa (PR) y el índice de desempeño estructural (IDE).

La metodología permitió **jerarquizar formulaciones de manera reproducible**, identificando aquellas capaces de mantener estabilidad y fidelidad al imprimir modelos anatómicos complejos. Este enfoque complementa las técnicas reológicas convencionales y sienta las bases para optimizaciones futuras e integración de herramientas de inteligencia artificial en biofabricación.

**Palabras clave:** Bioimpresión por extrusión, biotintas híbridas, hidrogeles naturales, evaluación estructural, índice de precisión relativa, metodología VDI 2206.

## Abstract

Three-dimensional (3D) bioprinting by extrusion has emerged as a response to the growing need for solutions to organ shortages and the lack of physiologically relevant models in biomedical research. Globally, over 110,000 patients await organ transplants each year, while in Peru the donation rate is only 1.6 per million inhabitants. Despite hardware advances, bioink standardization remains limited: empirical approaches and ad-hoc tests prevail, restricting reproducibility and hindering translation to clinical applications.

To address this gap, this thesis proposes a **systematic methodological framework** based on the VDI 2206 guideline to assess the structural performance of hybrid bioinks directly from operational printing parameters. A *toolbox* of hydrogels (alginate, xanthan gum, gelatin, chitosan, and collagen) was evaluated through tests of extrudability, geometric fidelity, and collapse stability, integrating metrics such as the printability ratio (PR) and the structural performance index (IDE).

This methodology enabled **reproducible ranking of formulations**, identifying those capable of maintaining stability and fidelity when printing complex anatomical models. The proposed approach complements conventional rheological techniques and establishes a basis for future optimization and integration of artificial intelligence tools in biofabrication.

**Keywords:** Extrusion bioprinting, hybrid bioinks, natural hydrogels, structural evaluation, printability ratio, VDI 2206 methodology.

## **I. Introducción**

La escasez de órganos constituye una de las paradojas más crudas de la medicina moderna: el médico sabe cómo salvar vidas, pero no siempre dispone de los medios para hacerlo. Esta problemática se evidencia en Estados Unidos, donde más de 110,000 pacientes integraban la lista nacional de espera para trasplantes al cierre de 2022 (1). En el contexto peruano, la situación es igualmente crítica: la tasa de donación fue de solo

1.6 por millón de habitantes, con 5,970 personas en espera, 711 trasplantes realizados y más de 700 muertes estimadas por falta de órganos en 2017 (2, 3). Aunque la normativa peruana adopta un sistema de consentimiento presunto (opt-out), en la práctica el 63 % de las familias rechaza la donación (3). Además, la legislación permite el procuramiento únicamente tras muerte encefálica, excluyendo otras modalidades hasta contar con una regulación robusta (2). Este desajuste cultural y normativo limita el acceso al trasplante y acentúa el dilema ético del trasplante alogénico.

Frente a esta realidad, la ingeniería de tejidos emerge como una alternativa estructural a largo plazo al proponer el desarrollo de sustitutos biológicos anatómico-funcionales que no dependan de la muerte de un paciente. Paralelamente, ofrece soluciones de impacto inmediato en el ámbito preclínico: el diseño de modelos fármaco-toxicológicos que reproduzcan con mayor fidelidad la biomimética estructural, superando las limitaciones de los cultivos bidimensionales y reduciendo el uso de animales de experimentación (4).

Una tecnología clave que viabiliza estos avances es la bioimpresión 3D, ya que permite trabajar con células, moléculas de señalización y biomateriales bajo control espacial y temporal preciso (4-6). No obstante, los biomateriales empleados como matriz principal aún requieren optimización y validación para aplicaciones específicas. Esta carencia mantiene a la bioimpresión en fases tempranas de desarrollo, dominadas por esquemas de prueba y error que dificultan la estandarización y reproducibilidad de resultados (7). Esta fragmentación metodológica retrasa la transición a niveles superiores de preparación tecnológica (TRL), en particular en el diseño y escalamiento de materiales con potencial clínico

o comercial. Actualmente, la bioimpresión 3D alcanza TRL 6–7 en hardware, mientras que los biomateriales permanecen en TRL 3–5; incluso materiales de alto costo (hasta 500 dólares por 5 mL) se limitan a aplicaciones en tejidos planos como córnea, donde ya se reportan ensayos clínicos fase I–II (8).

La caracterización funcional de estos materiales suele apoyarse en métodos empíricos o pruebas ad hoc, carentes de un marco sistemático que permita un cribado rápido y comparativo. El reómetro rotacional de placas paralelas es la técnica estándar para estimar propiedades como viscosidad y tixotropía (9); sin embargo, su alto costo y la necesidad de personal especializado limitan su uso rutinario (10, 11). Los ensayos propuestos en esta tesis buscan complementar estas mediciones, ofreciendo alternativas más accesibles y estandarizadas para facilitar la evaluación comparativa.

En este contexto, la presente tesis plantea un enfoque centrado en el análisis cuantitativo del comportamiento de impresión directamente desde la bioimpresora, tomando como criterios de estandarización funcional variables operativas como presión y velocidad. Estudios previos de Rau et al. han demostrado, mediante reometría, que un material de extrusión debe cumplir tres criterios esenciales: fluir sin bloquear las jeringas ni generar inestabilidades, solidificarse rápidamente para mantener su forma tras la deposición y resistir deformaciones post-extrusión (10, 11). Esta metodología estructurada y replicable permite avanzar hacia una ingeniería racional de biomateriales enfocada en el desempeño físico-funcional.

## **II. Pregunta de investigación, hipótesis y objetivos**

Esta tesis propone responder la pregunta: ¿En qué medida una arquitectura metodológica de evaluación sistemática basada en parámetros operativos de impresión permite realizar un screening rápido y reproducible del comportamiento estructural de materiales sintetizados en laboratorio para bioimpresión 3D por extrusión?

Hipótesis: El desarrollo de una arquitectura metodológica de evaluación sistemática permitirá llevar a cabo un proceso de screening rápido, reproducible y orientado al desempeño estructural de materiales sintetizados en laboratorio para bioimpresión 3D por extrusión, facilitando su selección y optimización técnica desde parámetros operativos del propio sistema de impresión.

## **2.1 Objetivos**

### **Objetivo general**

Desarrollar una arquitectura metodológica de evaluación sistemática que permita realizar un screening rápido, funcional y reproducible del comportamiento estructural de materiales sintetizados en laboratorio para bioimpresión 3D por extrusión, empleando variables operativas obtenidas directamente desde la plataforma CELLINK BIO-X.

### **Objetivos específicos**

- Diseñar un toolbox de hidrogeles híbridos de uso común en bioimpresión por extrusión (alginato, gelatina, goma xantana, quitosano y colágeno), organizando sus propiedades estructurales relevantes para su evaluación funcional.
- Caracterizar la capacidad de extrusión inicial de los hidrogeles mediante dispensación controlada con jeringas convencionales y boquillas de calibre 22G a fin de identificar formulaciones viables para procesos posteriores.
- Analizar el desempeño operativo de los hidrogeles seleccionados mediante la parametrización de velocidad y presión en la plataforma CELLINK BIO-X, con el objetivo de cuantificar su comportamiento durante la extrusión.
- Evaluar la estabilidad estructural inmediata de los materiales bajo condiciones óptimas de impresión, considerando su capacidad de recuperación post-extrusión y resistencia frente a la deformación por gravedad.
- Imprimir un modelo anatómico complejo con los hidrogeles que presenten el mejor desempeño estructural, validando funcionalmente el proceso de selección metodológica.

## 2.2 Alcances y limitaciones

Esta tesis se centra específicamente en la evaluación de la capacidad de impresión de biotintas mediante deposición directa asistida por extrusión, considerando variables operativas como presión, velocidad y flujo de material. No se aborda la optimización detallada de las formulaciones químicas más allá de sus proporciones básicas, ni se exploran rutas alternativas de síntesis o modificación química de los polímeros empleados.

Tampoco se incluyen estudios de esterilización del material ni la validación de protocolos de esterilidad bajo condiciones reales de laboratorio o producción. No se evalúan las propiedades microestructurales mediante técnicas como microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía confocal o análisis de porosidad tridimensional.

Quedan fuera del alcance de este estudio la caracterización de propiedades térmicas (calorimetría diferencial, análisis termogravimétrico), así como la determinación de propiedades mecánicas post-reticulación bajo condiciones fisiológicas simuladas. Igualmente, no se analizan la capacidad de liberación controlada de fármacos o factores bioactivos, ni la estabilidad química o reológica de las formulaciones en almacenamiento prolongado.

No se realiza la evaluación de citotoxicidad ni ensayos biológicos *in vitro* o *in vivo* para determinar la biocompatibilidad celular o tisular de los hidrogeles. Tampoco se contemplan estudios de respuesta inflamatoria, inmunogenicidad ni integración con matrices biológicas reales.

El trabajo no incluye la validación en otras plataformas comerciales de bioimpresión, ni la comparación sistemática entre diferentes geometrías de boquilla. No se desarrollan simulaciones computacionales de flujo ni ensayos de reticulación.

Finalmente, no se considera la evaluación de escalabilidad industrial del proceso ni la validación regulatoria o clínica de las formulaciones. Por tanto, los resultados obtenidos deben interpretarse en el marco experimental específico planteado, reconociendo que está orientado a caracterizar el desempeño de impresión en condiciones de laboratorio.

### 2.2.1 Estimación referencial de costos de materiales y consumibles

Se presenta una estimación referencial de costos de los principales materiales y consumibles empleados en bioimpresión 3D por extrusión. Los precios son aproximados y no incluyen costos de mano de obra, energía, depreciación de equipos ni esterilización. La información se muestra en dos tablas: la primera resume los materiales y consumibles con su costo unitario; la segunda ejemplifica el costo de preparar 5 mL de una biotinta A11–Xa1–Gel1 %.

Tabla 2.1: Costos referenciales de materiales y consumibles (precios realistas)

Insumo	Presentación	Precio(USD)
Alginato de sodio (Sigma-Aldrich)	500 g por frasco	350 (0.70/g)
Goma xantana (Bob's Red Mill)	500 g por bolsa	30 (0.06/g)
Gelatina tipo B (Sigma-Aldrich)	500 g por frasco	150 (0.30/g)
Quitosano (mosca soldado negra <i>Hermetia illucens</i> , extracción interna)	Lote estimado 50 g	500 (10.00/g)
Colágeno (residuos marinos, extracción interna)	Lote estimado 50 g	800 (16.00/g)
Ácido acético glacial (Merck)	2.5 L por botella	80 (0.032/mL)
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> ) (J.T. Baker)	500 g por frasco	50 (0.10/g)
Boquilla 22G (Cellink, reutilizable)	Unidad	80 (vida útil 50 usos)
Jeringa estéril 5 mL (Cellink)	Unidad desechable	3
Molde PLA impreso (FDM)	1 pieza (≈50 g PLA)	10

Tabla 2.2: Ejemplo: costo de preparar 5 mL de biotinta A11–Xa1–Gel1 % (precios realistas)

Concepto	Costo (USD)
Alginato 1% (0.05 g a 0.70/g)	0.035
Goma xantana 1% (0.05 g a 0.06/g)	0.003
Gelatina 1% (0.05 g a 0.30/g)	0.015
Subtotal materias primas	≈0.053
Jeringa 5 mL cellink(1 uso)	3.00
Boquilla 22G (prorratio 50 usos, 80 USD)	1.60
<b>Total estimado (5 mL A11–Xa1–Gel1 %)</b>	<b>≈4.65</b>

### **III. Marco teórico y estado de la cuestión**

Este capítulo presenta los fundamentos conceptuales y técnicos que sustentan el desarrollo metodológico de esta tesis. Se revisan los biopolímeros más empleados en bioimpresión por extrusión, los criterios funcionales que determinan su comportamiento estructural y los enfoques comunes de evaluación operativa. Aunque no se propone un nuevo material, esta investigación se distingue por organizar y sistematizar prácticas dispersas, integrándolas en una arquitectura de análisis funcional reproducible y orientada al desempeño.

#### **3.1 Biopolímeros empleados en bioimpresión por extrusión**

El empleo de biomateriales para tratar patologías o traumas bajo el enfoque de la ingeniería de tejidos o la medicina regenerativa no es, en absoluto, una novedad. Hace ya más de tres mil años, los egipcios utilizaban el \*catgut\*, un material derivado de la submucosa de tejidos gástricos, compuesto principalmente por colágeno, elastina y otras lipoproteínas (12). Sin embargo, no fue sino hasta el siglo XX que se comprendió la verdadera naturaleza de los polímeros como macromoléculas covalentes repetitivas y no meros aglomerados coloidales (13). Este nuevo paradigma, acompañado del desarrollo de nuevas técnicas de manufactura como el moldeo y síntesis química, permitió su aplicación extensiva durante y después de la Segunda Guerra Mundial, no solo como suturas, sino también como catéteres y válvulas cardíacas (14).

En 1960, Otto Wichterle y Drahoslav Lím se embarcaron en la búsqueda de un polímero que facilitara el transporte de metabolitos a través de membranas inteligentes; materiales capaces de absorber agua, hincharse y, al degradarse, no desencadenar una respuesta inflamatoria violenta. Así nació el HEMA (hidroximetilmetacrilato, o más precisamente, 2-hidroxietil metacrilato), una red polimérica reticulada, suave, permeable, flexible y biocompatible. Esta innovación marcó un hito: pronto se adoptó en lentes de contacto blandas, recubrimientos de implantes, sistemas de liberación de fármacos, y eventualmente, como base para

hidrogeles biofuncionalizados (15, 16).

Su historia no terminó allí. En 1976, Robert Langer propuso su uso como vehículo para la liberación controlada de fármacos, aprovechando mecanismos de difusión no fickeanos mediados por la microporosidad, deformación y relajación del esqueleto molecular (17). Más adelante, en 2003, Thomas Boland modificó una impresora de escritorio HP para permitir la deposición precisa de células vivas mediante inyección controlada. Este gesto sencillo casi artesanal lo convirtió en el pionero de la bioimpresión tridimensional (18).

El auge académico de esta tecnología de manufactura se consolidó entre los años 2010 y 2015, con publicaciones de alto impacto lideradas por investigadores como Gabor Forgacs, Anthony Atala y Jennifer Lewis, quienes demostraron la posibilidad de imprimir tejidos complejos con estructuras vasculares funcionales (19-21). Paralelamente, surgieron las primeras bioimpresoras comerciales Organovo, Cellink y Allevi marcando el inicio de su industrialización (22).

Con ello, el uso de biopolímeros como el alginato, la gelatina, el quitosano, el colágeno y la goma xantana se consolidó en la literatura científica, tanto por sus propiedades reológicas como por su compatibilidad celular (23-26). Estos materiales son abordados en el presente trabajo de tesis, y a continuación se detallarán en detalle sus propiedades y aplicaciones específicas en bioimpresión por extrusión.

### **3.1.1 Alginato de sodio**

El alginato es un polisacárido lineal extraído de algas marrones, compuesto por unidades  $\beta$ -D-manurónico (M) y  $\alpha$ -L-gulurónico (G), dispuestas en bloques M–M, G–G y M–G. A pH fisiológico presenta carga negativa por la ionización de sus grupos carboxilo, permitiendo el entrecruzamiento iónico con  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el modelo “egg-box”, principalmente entre residuos G–G (7, 27, 28). El hidrogel resultante es biocompatible, pero con baja resistencia mecánica y adhesividad celular, lo que justifica su combinación con otros polímeros para mejorar sus propiedades estructurales y biológicas. Ha sido ampliamente empleado en bioimpresión tridimensional para regeneración ósea, dérmica y cartilaginosa, apósitos, cultivos celulares y sistemas de liberación de fármacos (29, 30).

### **3.1.2 Gelatina**

Derivada por hidrólisis del colágeno, la gelatina pierde su estructura helicoidal triple, pero conserva capacidad para formar geles termo-reversibles mediante enlaces de hidrógeno. Es biocompatible, ligeramente aniónica a pH fisiológico y contiene secuencias RGD que favorecen la adhesión celular. Su baja estabilidad a 37 °C exige modificaciones como GelMA o mezclas con polímeros como alginato o quitosano para bioimpresión estructuralmente estable (31, 32). Ha sido aplicada en la ingeniería de tejidos de piel, hígado, cartílago y sistemas de liberación controlada.

### **3.1.3 Goma xantana**

La goma xantana es un polisacárido aniónico secretado por *Xanthomonas campestris*, con una cadena principal de D-glucosa y ramificaciones de ácido D-glucurónico y manosas. Su estructura tridimensional le confiere alta viscosidad y comportamiento pseudoplástico. A pH fisiológico, los grupos carboxilo le otorgan carga negativa, permitiendo interacciones con cationes o polímeros catiónicos. Su uso combinado con agarosa ha demostrado mejorar la fidelidad de impresión sin post-tratamiento, y se emplea como matriz inerte en bioimpresión neuronal (33, 34).

### **3.1.4 Quitosano**

El quitosano, derivado de la desacetilación de la quitina, está compuesto por D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. A pH ácido, sus grupos amino se protonan, otorgándole carga positiva y solubilidad en agua. Puede entrecruzarse físicamente con TPP o térmicamente con  $\beta$ -GP para formar hidrogeles inyectables, o covalentemente con genipina para mayor rigidez (35, 36). Posee propiedades antibacterianas, hemostáticas y quelantes.

### 3.1.5 Colágeno

El colágeno, especialmente el tipo I, es una proteína estructural que forma hélices triples con motivos RGD y GFOGER que favorecen la adhesión celular. Aunque es biocompatible, sufre contracción celular al ser impreso, lo que compromete la estabilidad estructural. Para contrarrestarlo, se emplean estrategias como el entrecruzamiento con riboflavina o su mezcla con ácido hialurónico, logrando mantener la forma y viabilidad celular en modelos cardíacos impresos con hiPSC (37, 38).

A continuación, se presenta un resumen comparativo de los principales hidrogeles naturales utilizados en bioimpresión tridimensional por extrusión. Cada uno de estos biomateriales se caracteriza por una estructura química específica que condiciona su comportamiento fisicoquímico, su carga neta en condiciones fisiológicas, y por ende, su capacidad de formar hidrogeles estables y biocompatibles. Esta tabla sintetiza sus ventajas funcionales, limitaciones técnicas y las referencias más relevantes extraídas de la literatura científica utilizada en este trabajo.

Tabla 3.1: Comparación estructural y funcional de biopolímeros utilizados en bioimpresión 3D por extrusión.

Biopolímero	Estructura química	Carga	Tipo de entrecruzamiento	Ventajas	Limitaciones	Bioimpresión	Modificable	Aplicaciones	Referencias
Alginato	Ácido $\beta$ -D-manurónico y $\alpha$ -L-gulurónico (M-G)	Negativa	Iónico con $\text{Ca}^{2+}$	Gelifica rápido, poroso, biocompatible	Poca adhesión celular	Sí	Sí	Regeneración ósea, piel, cartilago, DDS	(27-30)
Gelatina	Derivado de colágeno (Gly-Pro-Hyp)	Neutra / leve negativa	Física / química (GelMA, TG, GA)	Bioactiva, RGD, suave	Baja estabilidad térmica	Sí	Sí	Piel, hígado, cartilago, fármacos	(31, 32)
Goma xantana	Glucosa trisacárido + latera I (GlcA-Man-Man-pir)	Negativa	Física, electrostática	Alta viscosidad, pseudoplástica	Poca adhesión celular	Sí	Parcial	Modelos neuronales, soporte estructural	(33, 34)
Quitosano	D-glucosamina + N-acetilglucosamina (DD variable)	Positiva	Electrostática (TPP), térmica ( $\beta$ -GP), covalente	Antibacteriano, hemostático, gelifica in situ	Insoluble a pH neutro	Sí	Sí	Regeneración hepática, cartilago, SNC	(35, 36)
Colágeno	Hélice triple (2 $\sigma$ 1, 1 $\sigma$ 2) con RGD, GFOGER	Neutra	Física, fotoquímica (riboflavina)	Bioactivo, adhesión celular, autoensamblaje	Contracción celular, estructura débil	Sí	Sí	Corazón, piel, vasos	(37, 38)

### 3.1.6 Razonamiento para combinaciones estructurales

La integración de múltiples biopolímeros en formulaciones compuestas responde a la necesidad de equilibrar propiedades fisicoquímicas y biofuncionales específicas, difíciles de encontrar en un solo material. Por ejemplo, la rápida gelificación iónica

del alginato contrasta con su escasa adhesividad celular (7, 27), mientras que polímeros como la gelatina o el colágeno proveen dominios bioactivos pero son térmicamente inestables a 37 °C (31, 37). Otros materiales como la goma xantana o el quitosano aportan comportamiento pseudoplástico, propiedades antibacterianas o interacciones iónicas que mejoran la reología y funcionalidad de la mezcla (34, 35). La combinación estratégica de estas características permite formular biotintas más robustos, imprimibles y biocompatibles, con mejor desempeño mecánico, estructural y biológico.

Este proceso de formulación no será abordado de forma empírica, sino bajo una lógica de ingeniería fundamentada en la directriz VDI 2206, que permite estructurar el diseño de sistemas mecatrónicos como las tintas bioimpresas en función de requerimientos, validaciones cruzadas y toma de decisiones iterativa (39, 40). Así, se plantea un marco metodológico que guíe la selección racional de combinaciones binarias o ternarias, garantizando reproducibilidad, trazabilidad bibliográfica y adecuación al tipo de tejido objetivo.

### **3.2 Propiedades estructurales requeridas por las tintas de biomaterial**

Aunque ampliamente empleados, los biopolímeros descritos aún presentan limitaciones que requieren optimización, manteniendo a la bioimpresión en una etapa incipiente caracterizada por enfoques empíricos que limitan la estandarización y comprometen la reproducibilidad experimental (41).

Existen diversas tecnologías y métodos de bioimpresión, como la estereolitografía, la inyección de tinta y la bioimpresión asistida por láser. No obstante, la más ampliamente utilizada en aplicaciones con hidrogeles es, sin duda, la escritura directa con tinta (Direct Ink Writing, DIW) por extrusión (4, 6). Esta técnica permite la deposición controlada de la biotinta a través de un sistema de extrusión, que puede operar mediante presión neumática, tornillo rotatorio u otros mecanismos, según las propiedades reológicas del material(41).

Rau et al. (2023) definieron tres subfunciones críticas que un material debe cumplir

para ser exitosamente procesado mediante escritura directa con tinta (DIW). La primera es la extrusión, que implica que el material pueda fluir de manera continua a través del canal de salida (boquilla) sin obstrucciones. Para ello, la biotinta debe exhibir un comportamiento no newtoniano, típicamente pseudoplástico, caracterizado por una transición sol-gel. Esto le permite fluir bajo altos esfuerzos cortantes y recuperar su viscosidad en reposo tras la deposición. Esta transición funcional está directamente relacionada con la segunda subfunción: solidificación, que requiere que el material retenga su forma inmediatamente después de ser depositado, evitando deformaciones por escurrimiento. Finalmente, la tercera subfunción es el soporte de capas, que evalúa si el material solidificado puede sostener el peso de capas adicionales sin colapsar, garantizando la estabilidad estructural de la impresión tridimensional (10, 11). Se presenta a continuación un esquema sencillo de lo mencionado:

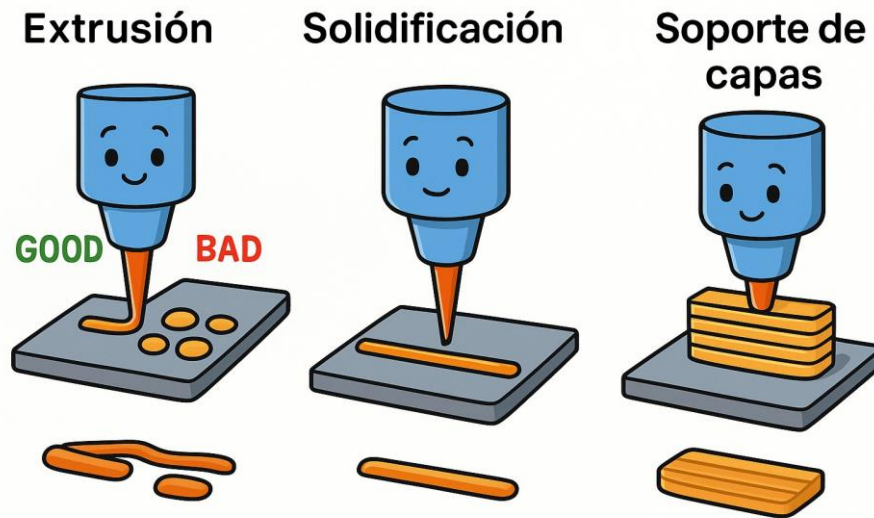


Figura 3.1: Esquema de las tres subfunciones reológicas críticas del proceso de escritura directa con tinta (DIW). La extrusión requiere un flujo continuo y uniforme del material (izquierda), la solidificación inmediata posterior evita la deformación (centro), y el soporte de capas demanda suficiente resistencia estructural del material depositado (derecha). Esquema de autoría propia-generado con asistencia de la inteligencia artificial Chat-GPT. A continuación se tratarán cada una de estas subfunciones en detalle y los parámetros cuali-cuantitativos útiles para su tratamiento.

### **3.2.1 Extrudabilidad y continuidad de flujo**

La extrudabilidad se define como la capacidad del material para fluir a través de una boquilla (nozzle) o aguja (needle) sin obstrucciones, con mínima ruptura del filamento y sin deformaciones transversales significativas (42).

Como etapa preliminar en la evaluación de biotintas, esta tesis propone un método de cribado simple: la dispensación manual mediante jeringas de 3 a 5mL cargadas con el material de interés, aplicadas directamente sobre una superficie plana (como una placa Petri). Esta estrategia, de bajo costo y rápida ejecución, ya ha sido sugerida por Paxton et al. (2017) como paso inicial para verificar de forma práctica el comportamiento de la biotinta durante la extrusión (43). Si bien otras aproximaciones emplean directamente bioimpresoras para evaluar la extrudabilidad en condiciones controladas (41), incluso en dichos sistemas automatizados, el primer criterio sigue siendo la observación visual de la formación del filamento, lo cual puede reproducirse cualitativamente mediante esta dispensación manual, antes de avanzar a caracterizaciones reológicas o pruebas de implementación directa compleja.

### **3.2.2 Retención de forma y gelificación post-impresión**

Después de la extrusión, el material debe recuperar rápidamente su estructura semisólida para mantener la forma impresa sin disgregarse. Este fenómeno está estrechamente relacionado con la capacidad del material de solidificarse tras cesar el esfuerzo cortante, evitando la deformación lateral. Como es conocido en la extrusión de polímeros, una mayor presión durante la dispensación incrementa la cantidad de material depositado, mientras que una mayor velocidad de impresión puede inducir un efecto de estiramiento que impide la relajación de las cadenas poliméricas, dificultando su aglomeración, lo que compromete la estabilidad del filamento (44).

Los parámetros operativos críticos que definen esta fase son principalmente la presión de extrusión y la velocidad de desplazamiento. No obstante, otro factor igualmente relevante es la altura de capa, entendida como la distancia entre la boquilla y la superficie de impresión. Si esta distancia es demasiado reducida, puede obstruirse el

canal e impedir la salida del material; por el contrario, si es demasiado elevada, el filamento puede depositarse de forma incontrolada, generando deformaciones o trayectorias no deseadas (45).

Una forma eficiente de controlar estos parámetros es mediante el uso directo de G-code(46), el lenguaje que interpreta todo equipo de control numérico por computador. Generalmente, se parte de un archivo CAD que, a través de un software slicer, es convertido en G-code. Sin embargo, la escritura directa de este código ofrece una ventaja considerable: permite un control preciso sobre la cantidad de material depositado, la velocidad de desplazamiento del cabezal, la presión de extrusión e incluso la variación de la altura de capa (47).

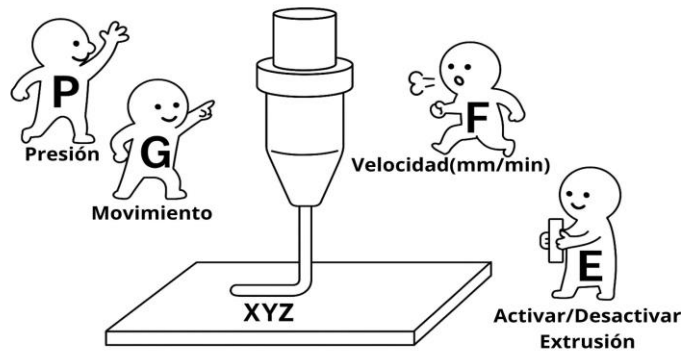


Figura 3.2: Representación conceptual de los principales comandos G-code utilizados en bioimpresión 3D por extrusión. Cada letra indica una instrucción clave.

Una forma práctica y cuantitativa de evaluar la resolución de impresión entendida como el grado de fidelidad entre el modelo diseñado por computadora y el objeto impreso es mediante la medición del grosor o el área de la hebra extruida (43). En esta tesis, se considerará como mayor resolución aquella en la que la hebra sea más delgada, siempre que esta mantenga su continuidad sin cortarse ni deformarse significativamente.

Cabe destacar el trabajo de Dageon Oh et al., quienes aplicaron redes neuronales para optimizar los parámetros de impresión a partir de datos reológicos. Aunque este enfoque excede el alcance de la presente investigación, su metodología respecto a la medición de hebras es comparable a la del presente trabajo. Por tanto, los datos

generados en este estudio podrían ser aprovechados en el futuro para implementar modelos similares de optimización (48).

### 3.2.3 Evaluación combinada de fidelidad de fusión y circularidad

Diversos estudios han establecido métricas confiables para evaluar la calidad de impresión en bioimpresión tridimensional por extrusión. Por un lado, Nguyen et al. (2024) propusieron el *filament fusion test*, una prueba que consiste en imprimir una malla con distancias variables entre filamentos y medir el grado de fusión de los poros resultantes, en función del porcentaje de reducción del área teórica respecto al modelo diseñado (49). Por otro lado, Ouyang et al. (2016) propusieron una forma semicuantitativa de evaluar la circularidad de los poros mediante la expresión  $Pr = 4\pi A/L^2$ , donde  $A$  es el área y  $L$  el perímetro del poro impreso. Valores cercanos a 1 indican estructuras cuadradas bien definidas, mientras que valores cercanos a  $\pi/4$  reflejan fusión o deformación circular del poro (50).

En esta tesis se propone una metodología que integra ambos enfoques de forma simultánea. Para ello, se diseña una malla diagonal de poros con diferentes dimensiones ( $1 \times 1$  a  $5 \times 5$  mm<sup>2</sup>), distribuidos en un solo modelo de prueba (ver Figura 3.3). Esta configuración permite evaluar la capacidad de la biotinta para mantener filamentos separados, observar el colapso progresivo en poros de menor tamaño, y medir la circularidad de los poros impresos en diferentes condiciones estructurales, facilitando una lectura cruzada con el grado de gelificación. La ventaja de concentrar la evaluación en una sola imagen es doble: permite reducir el tiempo de análisis y estandarizar la selección de biotintas viables. En conjunto, esta estrategia contribuye a establecer criterios objetivos de calidad estructural.

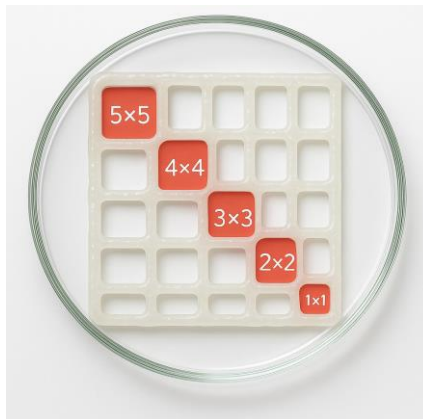


Figura 3.3: Modelo propuesto para la evaluación de circularidad y fusión de hebra. La malla diagonal incluye poros con diferentes separaciones entre filamentos (1 a 5 mm<sup>2</sup>). Esquema de autoría propia-generado con asistencia de la inteligencia artificial Chat-GPT.

### 3.2.4 Estabilidad estructural frente a cargas gravitacionales

En bioimpresión por extrusión, la estabilidad del constructo recién depositado depende críticamente de su resistencia frente a la deformación inducida por la gravedad. Este comportamiento, vinculado al creep inicial de la biotinta, es especialmente notable en formulaciones con baja viscosidad o sin reticulación inmediata, donde la hebra sufre colapsos parciales que comprometen la geometría del modelo (51).

Una forma estandarizada de cuantificar esta pérdida estructural es el *filament collapse test*, que consiste en imprimir hebras sobre pilares espaciados y evaluar el colapso en función del *Collapse Factor* ( $C_f$ ), definido como  $C_f = 1 - \frac{A_r}{A_t} \times 100\%$ , donde  $A_r$  es el área real del poro colapsado y  $A_t$  el área teórica diseñada (52). Valores más altos de  $C_f$  reflejan mayor deformación estructural.

Este índice permite comparar formulaciones de forma rápida y reproducible, incluso en etapas tempranas de desarrollo, facilitando la selección de biotintas con adecuada resistencia inicial sin necesidad de ensayos mecánicos extensos.

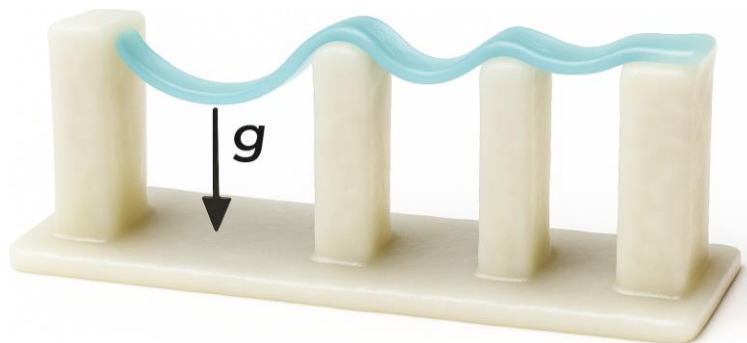


Figura 3.4: Representación tridimensional del *filament collapse test*. Una hebra de hidrogel es depositada sobre columnas espaciadas a distintas distancias. Bajo la acción de la gravedad ( $g$ ), se produce una deformación progresiva que permite cuantificar la resistencia estructural de la biotinta. Esquema de autoría propia-generado con asistencia de la inteligencia artificial Chat-GPT.

### **3.3 Justificación del uso de la plataforma CELLINK BIO-X en la caracterización funcional de biotintas**

El desarrollo experimental de esta tesis se llevó a cabo utilizando la plataforma de bioimpresión tridimensional CELLINK BIO-X, una de las más versátiles y ampliamente adoptadas en el ámbito académico para estudios en ingeniería de tejidos. Su elección no responde únicamente a una disponibilidad local, sino a una evaluación crítica de sus capacidades técnicas, las cuales se alinean estrechamente con los requerimientos metodológicos de este trabajo.

En primer lugar, la BIO-X permite el uso de cabezales intercambiables que operan mediante extrusión neumática, mecánica o térmica, lo que facilita la impresión de una amplia gama de formulaciones hidrogelificadas, incluyendo aquellas compuestas por alginato, colágeno, gelatina, quitosano y goma xantana. Esta flexibilidad resulta crucial para el objetivo central de esta tesis: evaluar combinaciones estructurales de biotintas con propiedades reológicas contrastantes bajo condiciones operativas controladas.

Además, la plataforma ofrece un control preciso sobre parámetros críticos como presión de extrusión, velocidad de impresión, altura de capa, temperatura del cabezal y cama de impresión, lo que permite implementar con exactitud los protocolos de validación de extrudabilidad, fidelidad geométrica y resistencia estructural discutidos en secciones previas. El control de temperatura (rango de 4–250°C para el cabezal y 4–65°C para la base) es particularmente relevante en formulaciones termorresponsivas como las basadas en gelatina.

Otro aspecto fundamental es su cámara cerrada con filtros HEPA y sistema de esterilización por luz UV, que garantiza condiciones estériles durante la impresión y minimiza el riesgo de contaminación biológica. Esta característica es esencial para futuras etapas de validación biológica y cultivo celular, aunque en esta tesis se ha empleado solo para ensayos estructurales.

La validez científica de esta plataforma ha sido ampliamente corroborada en la literatura. Por ejemplo, Xu et al. (2023) utilizaron la BIO-X para imprimir parches

dérmicos con hidrogeles GelMA/SilMA, demostrando alta resolución y precisión dimensional (53). Asimismo, Matthiessen et al. (2023) lograron construir modelos neuronales con astrocitos empleando biotintas basados en ácido hialurónico, evidenciando que esta plataforma permite obtener geometrías complejas sin comprometer la viabilidad celular (54). Estas experiencias refuerzan su aplicabilidad incluso en etapas tempranas de formulación.

En conjunto, estas características convierten a la CELLINK BIO-X en una herramienta ideal para el enfoque propuesto en esta tesis.

### **3.4 El modelo en V en la metodología VDI 2206**

El enfoque en “V” es una metodología estructurada para el diseño y validación de sistemas mecatrónicos complejos, como los implicados en la bioimpresión. Este modelo se basa en una relación directa entre etapas de diseño y sus correspondientes fases de verificación y validación, organizadas en forma de V invertida.

En el lado izquierdo, se definen los requisitos del sistema, que se descomponen en funciones del subsistema y luego de sus componentes individuales. Estas se traducen en una arquitectura de solución que especifica cómo se integrarán los componentes, y culminan en la implementación física. En el ascenso por el lado derecho, cada nivel es verificado o validado: los componentes se prueban funcionalmente, los subsistemas se integran, evalúan y finalmente, el sistema completo se valida contra los requerimientos iniciales. Este enfoque asegura trazabilidad bidireccional. En el contexto de esta tesis, se adapta el modelo en V para estructurar el diseño racional de biotintas donde los biopolímeros y sus combinaciones representan componentes funcionales cuya selección, caracterización e implementación se vinculan a requisitos específicos de impresión (39, 40, 55).



Figura 3.5: Modelo en V adaptado al diseño de sistemas de bioimpresión. Este enfoque metodológico permite vincular de forma estructurada las etapas de diseño funcional de las formulaciones (lado izquierdo) con las fases de validación experimental y verificación (lado derecho).

#### IV. Materiales y métodos

En todo curso de anatomía se enfatiza la estrecha relación entre la estructura de los tejidos y órganos y sus respectivas funciones. Este mismo principio se aplica en la ciencia e ingeniería de materiales, donde las propiedades estructurales de cada biomaterial condicionan su desempeño funcional. En esta tesis se propone el uso de la metodología VDI 2206 como marco para abordar el diseño sistemático de biotintas, permitiendo partir de las características físicoquímicas de los materiales comúnmente empleados en ingeniería de tejidos para establecer los requisitos funcionales del sistema a desarrollar. A partir de estos requisitos, la metodología permite descomponer el problema en subfunciones, plantear una arquitectura de solución y ejecutar una implementación orientada a la verificación y validación, asegurando una trazabilidad directa con las propiedades estructurales inicialmente planteadas. Todos los procedimientos experimentales descritos se realizaron por triplicado, y los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico (media y

desviación estándar) para evaluar la reproducibilidad y la significancia de los resultados.

## 4.1 Materiales

Se utilizó gelatina tipo B (G9391, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), quitosano obtenido a partir de exoesqueletos de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) mediante desacetilación alcalina en el Laboratorio de Química de la Vida (LAVI-UPCH), colágeno extraído de residuos marinos procesado en el mismo laboratorio, ácido acético glacial (Merck, Alemania), goma xantana (Bob's Red Mill, Milwaukie, OR, USA) y alginato de sodio (A2033, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Asimismo, se preparó una solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ , 1311-01, J.T. Baker, USA) a una concentración de 100 mM. Los moldes empleados para los ensayos estructurales fueron fabricados en ácido poliláctico (PLA, Prusament, Prusa Research, República Checa) mediante impresión 3D por deposición fundida (FDM). La bioimpresión se llevó a cabo en una BIO X (Cellink, Suecia) equipada con jeringas estándar de 3mL (Cellink) y boquillas de calibre 22G(Cellink). Se emplearon conectores hembra-hembra Luer-Lock para el acoplamiento de los componentes. Las estructuras impresas se depositaron sobre cajas Petri plásticas estériles. Cada uno de los objetivos planteados se abordó mediante procedimientos experimentales y técnicos específicos diseñados para resolverlos de manera secuencial y funcional. En la Figura 4.1 se presenta el flujograma que resume los ejes metodológicos que guiaron el desarrollo del trabajo.

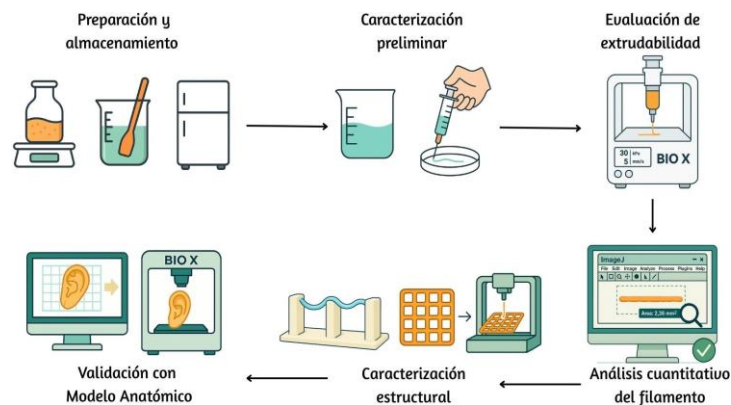


Figura 4.1: Flujograma de la metodología completa, desde la preparación de la biotinta

hasta la validación con modelo anatómico.

## **4.2 Diseño de un toolbox funcional de hidrogeles híbridos para bioimpresión por extrusión**

El diseño del *toolbox* se estructuró aplicando la metodología VDI 2206 (39, 40), adaptada en este trabajo al desarrollo de biomateriales para bioimpresión 3D. Esta metodología permitió planificar un proceso ordenado que incluyó la identificación de requisitos, la descomposición funcional del sistema y el diseño de combinaciones poliméricas que serían evaluadas experimentalmente.

En la etapa de identificación de requisitos, la metodología contempló la consulta de normas técnicas incluyendo la ASTM F3659-24 (56) y literatura científica relevante para establecer los parámetros que guiarían la selección y evaluación de los materiales. Estos parámetros se definirían durante el análisis y servirían de base para las etapas posteriores de diseño y validación.

La descomposición funcional se planteó como herramienta para relacionar los requisitos identificados con las funciones que debían cumplir las formulaciones durante el proceso de impresión. Este análisis permitiría enfocar la comparación de materiales en atributos operativos clave, sin anticipar su clasificación ni sus resultados.

Con base en este enfoque, se diseñó un procedimiento para generar combinaciones binarias y ternarias priorizando la evaluación de sinergias potenciales. El *toolbox* resultante funcionó como marco de referencia para la fase de validación experimental descrita en capítulos posteriores.

## **4.3 Caracterización de la capacidad de extrusión inicial de los hidrogeles mediante dispensación controlada manual.**

Tras el diseño racional del toolbox de tintas de biomaterial. Siguiendo la lógica metodológica del modelo en V de la directriz VDI 2206, esta sección aborda su implementación y verificación funcional inicial estableciendo correspondencias directas entre las propiedades estructurales proyectadas y el desempeño observado en condiciones reales de extrusión.

#### **4.3.1 Preparación de las formulaciones para evaluación estructural**

Las formulaciones seleccionadas del toolbox diseñado en la sección anterior se prepararon en concentraciones entre 1 y 4 % p/v. La preparación se llevó a cabo bajo agitación magnética continua durante un periodo de ocho horas, empleando placas calefactoras con control de temperatura (60 °C). En los casos en los que se utilizó ácido acético como disolvente particularmente en formulaciones con quitosano, se preparó una solución acuosa al 2 % v/v como medio de disolución previo a la incorporación de los materiales. Todas las soluciones fueron almacenadas a 4 °C durante 12 horas posteriores a su preparación para permitir la estabilización de las interacciones moleculares y garantizar condiciones reproducibles durante su posterior evaluación estructural. Las formulaciones fueron cargadas en condiciones asépticas dentro de jeringas estériles de 5 mL, retirando cuidadosamente las burbujas de aire antes de iniciar los ensayos de extrudabilidad y bioimpresión.

#### **4.3.2 Evaluación preliminar de extrudabilidad mediante dispensación manual**

Se implementó una prueba cualitativa de extrudabilidad basada en dispensación manual. Cada tinta fue cargada en jeringas convencionales de 3 a 5 mL y extruida sobre placas Petri estériles mediante boquillas de calibre 22G. Esta configuración buscó simular condiciones operativas básicas sin intervención automatizada.

Este procedimiento, adaptado de Paxton et.al. y O'Connell et.al. (41, 43), permite observar directamente aspectos críticos como la continuidad del filamento, la fluidez del material sin obstrucciones y la capacidad del hidrogel para conservar su forma tras la deposición. Aunque no proporciona métricas cuantitativas, su valor metodológico radica en su utilidad como filtro práctico para descartar formulaciones con bajo desempeño estructural en etapas tempranas de desarrollo (41, 42).



Figura 4.2: Se muestra la dispensación de una tinta azul sobre una placa Petri mediante jeringa con aguja 22G. La línea inferior conserva continuidad y forma(extruable), mientras que la línea superior presenta pérdida de definición y extensión irregular (no extruable). Esquema de autoría propia-generado con asistencia de la inteligencia artificial Chat-GPT.

#### **4.4 Análisis del desempeño operativo de los hidrogeles seleccionados mediante la parametrización de velocidad y presión en la plataforma CELLINK BIO-X**

Se implementó una etapa de parametrización sistemática en la plataforma CELLINK BIO-X para establecer las condiciones óptimas de impresión con las formulaciones que habían superado la evaluación preliminar de extrusión. Esta fase tuvo como objetivo definir una ventana operativa robusta que permitiera obtener trazos continuos, uniformes y reproducibles.

Se diseñó y empleó un G-code personalizado(véase Anexos) que permitió controlar de forma directa la presión neumática y la velocidad de impresión, evitando la dependencia del software slicer convencional y garantizando condiciones mecánicas controladas (57, 58). La presión fue ajustada dentro de un rango de 0.1 a 120 kPa, correspondiente al límite técnico de operación del equipo CELLINK BIO-X sin bomba de presión externa, mientras que las velocidades evaluadas fueron de 1, 5, 10, 15 y 20 mm/s considerando rangos comúnmente utilizados y reportados en la

literatura (41, 59). En todos los casos se mantuvo una altura de capa constante de 0.2 mm.

Los filamentos extruidos fueron capturados fotográficamente y analizados en ImageJ. Se realizaron mediciones triplicadas del área de cada filamento por configuración y se procesaron mediante scripts en Python, permitiendo cuantificar la influencia de cada parámetro sobre la uniformidad del trazo, la estabilidad de extrusión y la fidelidad morfológica de la impresión. Este procedimiento permitió identificar combinaciones de presión y velocidad adecuadas para cada biotinta, asegurando condiciones de impresión compatibles con su uso posterior en pruebas estructurales más complejas.

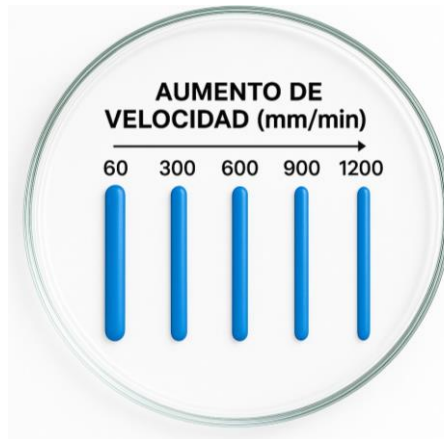


Figura 4.3: Evaluación de extrusión a diferentes velocidades de impresión según el G-Code diseñado. Esquema de autoría propia-generado con asistencia de la inteligencia artificial Chat-GPT.

#### **4.5 Evaluación de la estabilidad estructural inmediata de los materiales bajo condiciones óptimas de impresión**

Siguiendo el modelo en V de la metodología VDI 2206 (39, 40), la verificación del subsistema de solidificación se abordó mediante un protocolo que permite cuantificar la fidelidad geométrica y la estabilidad estructural de los hidrogeles inmediatamente después de su extrusión. Esta evaluación se constituye dentro del proceso de validación del *toolbox* diseñado, asegurando la trazabilidad entre los requisitos estructurales definidos y el desempeño observado en condiciones controladas de impresión. Para este análisis se empleó un patrón de macroporos en malla generado

mediante un G-code personalizado (véase Anexos). Dicho patrón, al permitir variar sistemáticamente el espaciado entre filamentos, facilita la caracterización de cómo las propiedades intrínsecas de cada formulación influyen en la conservación de la geometría impresa.

#### 4.5.1 Índice combinado de precisión y desempeño estructural

La fidelidad geométrica de cada formulación se evaluó mediante el Índice de Precisión de Impresión ( $PR$ ), definido como:

$$PR = \frac{L^2}{16A}$$

donde  $L$  es el perímetro y  $A$  el área del poro impreso (50, 60). Valores de  $PR$  menores y cercanos a 1 indican estructuras estables y fieles al diseño, mientras que valores mayores reflejan colapso o sobreextrusión. Este parámetro se calculó por triplicado para cada combinación de material y condición de impresión, obteniendo valores medios y su variabilidad. Con el fin de integrar simultáneamente la proximidad del  $PR$  al valor ideal y la dispersión de las mediciones, se propuso en este trabajo el Índice de Desempeño Estructural ( $IDE$ ):

$$IDE = \ln \left( 1 + \frac{1}{PR - 1 + \frac{\sigma_{PR}}{PR}} \right)$$

donde  $\overline{PR}$  representa la media y  $\sigma_{PR}$  la desviación estándar. Un  $IDE$  elevado indica condiciones óptimas, caracterizadas por alta precisión y baja variabilidad. El uso conjunto de  $PR$  e  $IDE$  permite jerarquizar las formulaciones del *toolbox* según su estabilidad inicial, estableciendo un criterio comparativo robusto.

#### 4.5.2 Evaluación del índice de colapso para estabilidad estructural inmediata

La estabilidad estructural de los hidrogeles se evaluó mediante un ensayo de colapso adaptado de metodologías previamente reportadas para biotintas por extrusión (9, 61). Este ensayo cuantifica la capacidad del filamento para mantenerse autoportante al ser depositado sobre perfiles sin soporte. Para este propósito se diseñó un soporte

de prueba en *Autodesk Fusion 360* y se fabricó mediante modelado por deposición fundida (FDM) en ácido poliláctico (PLA). El dispositivo presenta ranuras paralelas que generan perfiles separados de 1 a 6 mm, permitiendo evaluar la deformación del filamento bajo diferentes longitudes de separación bajo las condiciones de presión y velocidad optimizadas. Cada formulación se evaluó en triplicado para cada separación, generando un conjunto de datos reproducible. Las muestras impresas se registraron fotográficamente en alta resolución y se analizaron digitalmente para cuantificar el factor de colapso ( $Cf$ ), definido como el porcentaje de reducción del área teórica del filamento respecto al área real obtenida tras la impresión:

$$Cf(\%) = \frac{A_{tc} - A_{ac}}{A_{tc}} \times 100$$

donde  $A_{tc}$  es el área teórica del filamento que une los bordes del vano y  $A_{ac}$  es el área experimental medida posterior a la impresión. Valores cercanos a cero indican alta estabilidad estructural y mínima deformación por gravedad.

Los resultados de  $Cf$  para cada formulación y separación se expresaron como promedio

$\pm$  desviación estándar. Esta evaluación permitió establecer un ranking comparativo de estabilidad estructural entre biotintas híbridas y binarios utilizados en este estudio.

#### **4.6 Validación final mediante impresión de un modelo anatómico complejo**

Como fase de cierre en la aplicación del modelo metodológico VDI 2206, se realizará la impresión de un modelo anatómico complejo utilizando las formulaciones híbridas que mostraron el mejor desempeño en las etapas previas. Esta fase corresponde al nivel de *verificación y validación* del modelo en V, cuyo objetivo es comprobar la aplicabilidad real de las tintas de biomaterial optimizadas en escenarios que demandan alta precisión y estabilidad estructural

Para este propósito se consideraron dos geometrías: un modelo tridimensional de pabellón auricular humano, obtenido de la plataforma Cults3D y desarrollado por 3DPrintBunny (62), y un modelo de nariz utilizado a partir del repositorio de diseños anatómicos de la empresa TissueLabs. Ambos archivos en formato STL fueron sometidos a preprocesamiento *slicing* directamente desde la impresora CELLINK BIO X.

Las condiciones de impresión se configuraron a partir de los parámetros óptimos previamente determinados para cada hidrogel durante la etapa experimental de parametrización operativa.

Posterior a la fabricación, se realizó una evaluación integral que comprendió el análisis visual de la morfología global y la medición dimensional comparativa respecto al modelo digital de referencia. Este análisis permitió verificar que las formulaciones seleccionadas no solo fueran técnicamente imprimibles, sino que reprodujeran con fidelidad las complejidades anatómicas necesarias para su futura aplicación en el desarrollo de andamios personalizados y modelos preclínicos en ingeniería de tejidos. A continuación se presenta la matriz de operacionalización de variables utilizada a lo largo de este marco metodológico, detallando indicadores, técnicas e instrumentos para su medición.

Tabla 4.1: Matriz de operacionalización de variables

Variable principal	Dimensión	Indicador/Definición operativa	Instrumento/Técnica	Unidad/Escala
Desempeño estructural de la biotinta	Extrudabilidad	Flujo continuo y uniforme sin obstrucciones	Jeringa manual con boquilla 22G	Observación cualitativa
		Continuidad del filamento bajo presión controlada	BIO X con G-code personalizado	Observación cualitativa
	Retención de forma/gelificación	Área de sección transversal del filamento extruido bajo presión y velocidad controladas	BIO X + ImageJ + scripts en Python	mm <sup>2</sup> (media ± DE)
	Soporte de capas/estabilidad estructural	Índice de precisión de impresión (Pr) en malla porosa	BIO X + ImageJ	Adimensional (ideal = 1)

		Índice de colapso (Cf) en prueba de puente	BIO X + ImageJ	% de deformación estructural
Variables operativas del proceso	Presión de extrusión	Valor de presión aplicada a la biotinta	Control neumático de BIO X	kPa (0.1–120)
	Velocidad de impresión	Velocidad lineal del cabezal	G-code personalizado en BIO X	mm/s (1–20)
Validación funcional	Modelo anatómico complejo impreso	Fidelidad morfológica e integridad estructural del modelo anatómico (oreja humana)	BIO X + evaluación dimensional + ImageJ	Observación cualitativa

### Consideraciones de bioseguridad y gestión de riesgos

Las actividades del presente proyecto se desarrollaron en dos espacios experimentales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH): el Laboratorio de Química de la Vida (LAVI), y el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos. La preparación de las formulaciones hidrogel se llevo a cabo en el LAVI-LID, mientras que las pruebas de impresión y análisis estructural se ejecutaron en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, el cual cuenta con la bioimpresora BIO X (Cellink) y está clasificado como instalación de Nivel de Bioseguridad 2 (BSL-2).

Aunque este estudio no contempla el uso de células vivas, la manipulación de biopolímeros como quitosano, colágeno, alginato y goma xantana requiere condiciones asépticas que prevengan la contaminación cruzada y aseguren la reproducibilidad experimental. Por ello, se aplicó lo estipulado en la norma ISO 15190:2003, que establece el uso obligatorio de equipos de protección personal (guantes, gafas, mascarillas, batas), así como protocolos de desinfección de superficies y equipos con etanol al 70 % o hipoclorito de sodio al 10 % (63).

Todos los insumos en contacto con las formulaciones, incluidos jeringas, pistones, cartuchos y boquillas, fueron desinfectados después de cada uso. La BIO X cuenta, además, con sistema UV y filtro HEPA integrado, que se activó antes de cada sesión de trabajo para mantener condiciones de esterilidad.

Las pruebas de impresión se rigieron por la norma ASTM F3659-24, la cual proporciona directrices para evaluar la seguridad, eficacia y respuesta estructural de los hidrogeles utilizados por bioimpresión 3D(56). Se aplicaron estos criterios para asegurar la bioseguridad y la calidad físico-funcional de los constructos.

Para la gestión de residuos, se siguieron los lineamientos de la norma ASTM E3051-16. Los residuos sólidos como boquillas, puntas de jeringa y guantes se clasificaron por nivel de riesgo y fueron descartados en contenedores debidamente etiquetados. El material punzocortante fue eliminado inmediatamente después de su uso en contenedores rígidos resistentes a perforaciones, sin reencapsulado ni manipulación directa.(64-66).

El manejo de reactivos como ácido acético se llevo a cabo bajo las normas OSHA e ISO, utilizando campanas extractoras, guantes resistentes, gafas de seguridad, ventilación adecuada y almacenamiento en gabinetes ventilados con etiquetado reglamentario (67). .

Finalmente, todos los equipos críticos (bioimpresora) fueron sujetos a un programa de mantenimiento preventivo, en cumplimiento con las normas ISO 15190:2003 e ISO 35001:2019 (68). Este incluye limpieza, verificación operativa, calibración y documentación de cada intervención.

Para documentar las prácticas de manejo seguro en laboratorio, se incluye a continuación una tabla simplificada que describe los procesos experimentales previstos, el nivel de riesgo asociado (generalmente nulo o muy bajo dada la naturaleza inocua de los biomateriales empleados) y las medidas básicas de control.

Tabla 4.2: Identificación de riesgos y medidas de control.

<b>Actividad</b>	<b>Riesgo identificado</b>	<b>Medida de control</b>
Manejo de ácido acético 2 %	Irritación leve en piel o mucosas	Uso de guantes; evitar contacto directo.
Limpieza con detergentes	Irritación cutánea u ocular	Uso de guantes; enjuague inmediato con agua si hay contacto.
Uso de jeringas y boquillas	Lesión por objeto punzante	Manipulación cuidadosa; eliminación inmediata en contenedor rígido (tacho rojo).
Operación de bioimpresora	Golpes o atrapamiento menor	Evitar contacto con piezas móviles durante la operación.
Manejo de residuos plásticos	Generación de desechos	Disposición en bolsa común o según normativa local.

## V. Resultados

Este capítulo expone los resultados fundamentales obtenidos en la investigación, organizados según los objetivos planteados en el diseño metodológico.

### 5.1 Identificación de requisitos y descomposición funcional del sistema

La aplicación de la metodología VDI 2206 (39, 40), complementada con los lineamientos de la norma ASTM F3659-24 (56), permitió definir los requerimientos necesarios para el desarrollo de biotintas funcionales. Como se resume en la Figura 5.1, dichos parámetros se organizaron en dos ejes principales:

Por un lado, se identificaron las **propiedades fisicoquímicas**, entre cuyos requisitos funcionales destacan el comportamiento reológico, la capacidad de entrecruzamiento, las propiedades termo responsivas y dependientes de PH. Por otro lado, se definieron las **propiedades biofuncionales** esenciales con requisitos funcionales como la citotoxicidad, la promoción de adhesión y proliferación celular, el biomimetismo y la actividad antibacteriana.

La descomposición funcional del sistema permitió priorizar tres requisitos operativos fundamentales para la bioimpresión por extrusión: la *extrudabilidad*, entendida como el flujo estable del material a través de la boquilla; la *retención de forma*, necesaria para preservar la geometría tras la deposición; y la *capacidad autoportante*, clave para mantener la integridad estructural durante la construcción de arquitecturas tridimensionales multicapa.

El análisis comparativo de biopolímeros reveló que la gelatina y la goma xantana resultan eficaces en la modulación del comportamiento reológico, mientras que el alginato aporta capacidad de gelificación controlada. El quitosano ofrece actividad antimicrobiana, y el colágeno contribuye de manera significativa a la adhesión y proliferación celular. En conjunto, estos materiales cubren el espectro de funciones requeridas para las formulaciones híbridas empleadas. Para una descripción de sus características estructurales y biofuncionales, se remite al Capítulo 2.

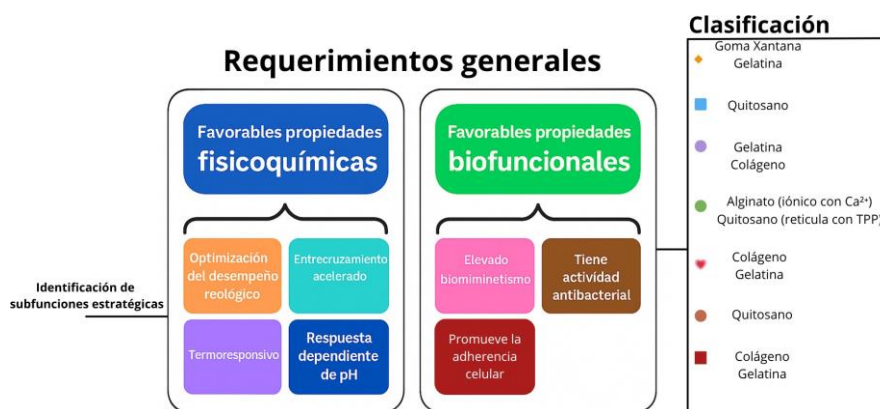


Figura 5.1: Clasificación de subfunciones estratégicas en bioimpresión 3D por extrusión y su relación con propiedades fisicoquímicas y biofuncionales. Se indica además la correspondencia con los materiales base utilizados en esta tesis.

## 5.2 Clasificación funcional y generación del biomaterial-toolbox

Como resultado del proceso anterior, se establecieron siete combinaciones binarias de biopolímeros con potencial estructural, seleccionadas en función de su capacidad para cubrir simultáneamente subfunciones críticas de la biotinta, como soporte mecánico, bioactividad y estabilidad durante la impresión.

Las formulaciones identificadas muestran propiedades complementarias considerando en todos los casos la gelatina y goma xantana, considerados estructurales. En particular, la combinación colágeno–quitosano se incluyó como control al no ser considerado estructural y debido a su potencial para generar un material con capacidad de adhesión celular y propiedades antimicrobianas, características deseables para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

En la Tabla 5.1 se resumen las combinaciones binarias seleccionadas, indicando los materiales constituyentes, la función esperada para cada mezcla y el disolvente empleado para su preparación. Todas las formulaciones se diseñaron considerando compatibilidad de disolución y potencial sinérgico en impresión por extrusión.

Tabla 5.1: Combinaciones binarias de hidrogeles estructurales, función esperada y disolvente recomendado.

<b>Material A</b>	<b>Material B</b>	<b>Función esperada</b>	<b>Solvente recomendado</b>
Goma Xantana	Alginato	Estructural, entrecruzamiento rápido	Agua
Goma Xantana	Gelatina	Estructural, adherencia celular	Agua
Gelatina	Alginato	Estructural, entrecruzamiento rápido	Agua
Colágeno	Goma Xantana	Estructural, adherencia celular	Agua
Gelatina	Quitosano	Estructural, antibacterial	Ácido acético
Colágeno	Quitosano	Adherencia celular y antibacterial	Ácido acético
Quitosano	Goma Xantana	Estructural, antibacterial	Ácido acético

Como extensión del análisis de combinaciones binarias, se plantearon formulaciones ternarias y cuaternarias que integran múltiples funcionalidades en una sola matriz polimérica. Estas combinaciones se diseñaron con el objetivo de maximizar el rendimiento estructural de la biotinta durante la impresión, incorporando simultáneamente propiedades biológicas específicas como la bioadhesión celular y la actividad antibacterial.

Las formulaciones ternarias incluyen tres biopolímeros complementarios que equilibran viscosidad, gelificación rápida y funcionalidad bioactiva. Por su parte, las formulaciones cuaternarias incorporan un cuarto componente para potenciar la estabilidad estructural y ampliar la versatilidad biofuncional del sistema.

En la Tabla 5.2 se resumen las combinaciones seleccionadas, indicando los componentes, la función esperada para cada mezcla y el disolvente recomendado.

Tabla 5.2: Combinaciones ternarias y cuaternarias de biopolímeros, función esperada y disolvente recomendado.

<b>Composición</b>	<b>Función esperada</b>	<b>Solvente recomendado</b>
Gelatina + Goma Xantana + Alginato	Estructural, entrecruzamiento rápido, adherencia celular	Agua
Goma Xantana + Gelatina + Quitosano	Estructural, bioadhesión, antibacterial	Ácido acético
Goma Xantana + Alginato + Quitosano	Estructural, entrecruzamiento rápido, antibacterial	Ácido acético
Gelatina + Alginato + Quitosano	Estructural, bioadhesión, entrecruzamiento rápido	Ácido acético
Alginato + Gelatina + Quitosano + Goma Xantana	Estructural, bioadhesivo, impresión estable	Ácido acético

En total se definieron doce combinaciones potenciales: siete binarias, cuatro ternarias y una cuaternaria. Estas formulaciones constituyen la matriz inicial de biotintas propuesta para evaluación experimental. Cada combinación fue diseñada estratégicamente para cubrir las subfunciones estructurales y biofuncionales identificadas en la etapa de descomposición funcional. La validación posterior de estas mezclas permitirá priorizar aquellas con mayor potencial para aplicaciones específicas en bioimpresión tridimensional por extrusión.

### **5.3 Caracterización de la capacidad de extrusión inicial de los hidrogeles mediante dispensación controlada manual.**

El cribado preliminar de extrudabilidad se aplicó a las combinaciones binarias y ternarias descritas en las Tablas 5.1 y 5.2, evaluadas mediante el procedimiento manual indicado en la sección 4.3.2. Las formulaciones se identifican mediante una nomenclatura abreviada que combina el material y su concentración en peso/volumen (p/v); por ejemplo, “Xa3” corresponde a goma xantana al 3 % p/v y “Al1” a alginato al 1 % p/v. Esta convención se mantiene en todo el capítulo para uniformidad en las figuras y descripciones.

Se prepararon ocho combinaciones de goma xantana con alginato, seis de goma xantana con gelatina, diez de gelatina con alginato, una de colágeno con goma xantana limitada por la baja disponibilidad de colágeno, cuatro de gelatina con quitosano y una de quitosano con colágeno. De igual manera se evaluaron tres formulaciones ternarias compuestas por alginato, gelatina y goma xantana. Todas las mezclas fueron ensayadas bajo condiciones homogéneas de extrusión manual con boquilla de calibre 22G.

La Figura 5.2 resume el estado de imprimibilidad y solubilidad de todas las combinaciones binarias y ternarias evaluadas, y sirvió como base para definir las formulaciones que progresaron hacia las etapas posteriores de impresión controlada.

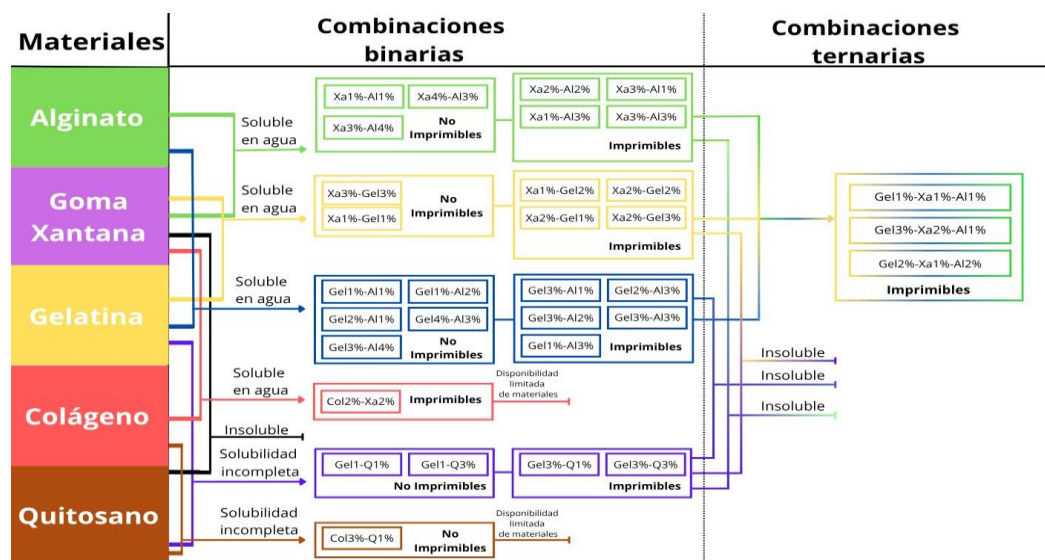


Figura 5.2: Resumen de combinaciones binarias y ternarias evaluadas mediante dispensación controlada manual.

Se identificaron formulaciones no imprimibles que compartieron dos mecanismos de falla principales: Deformación inmediata tras la deposición y obstrucción de la boquilla por formación de agregados o precipitados. En el primer grupo se encuentran las combinaciones Xa1-Gel1, Xa1-Al1, Gel1-Al1, Gel1-Al2, Gel2-Al1, Gel1-Q1, Gel1-Q3 y Col3-Q1, que colapsaron estructuralmente al carecer de resistencia para mantener su geometría tras la extrusión. En el segundo grupo se ubican Xa3-Gel3, Xa3-Al4, Xa4-Al3, Gel3-Al4 y Gel4-Al3, en las que se produjo acumulación de material dentro de la boquilla impidiendo el flujo continuo. En el caso específico de las mezclas con quitosano, se evidenció la formación de agregados dispersos en la

preparación, probablemente debido a variación del PH o trazas del proceso de extracción a partir de su materia prima, residuos de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*), lo que contribuyó a su inestabilidad y al bloqueo parcial del sistema de extrusión.

Un comportamiento particular se observó en las mezclas de quitosano con goma xantana: en todas las proporciones evaluadas se formaron precipitados inmediatos al mezclarse en ácido acético, explicados por la complejación polielectrolítica entre ambos biopolímeros. En estas condiciones, el quitosano se encuentra cargado positivamente por la protonación de sus grupos amino, mientras que la goma xantana aporta grupos carboxilato con carga negativa, resultando en complejos insolubles. Esta incompatibilidad intrínseca llevó a descartar desde esta fase todas las formulaciones ternarias y cuaternarias que contenían este par (goma xantana–alginato–quitosano, gelatina–alginato–quitosano, goma xantana–gelatina–quitosano y la cuaternaria alginato–gelatina–quitosano–goma xantana). Con el fin de ilustrar los criterios de clasificación aplicados, la Figura 5.3 incluye diez fotografías de referencia: cinco corresponden a formulaciones que superaron la prueba preliminar de extrudabilidad, caracterizadas por flujo estable y retención de la forma tras la deposición, y cinco a formulaciones que fallaron por inestabilidad o bloqueo de la boquilla.

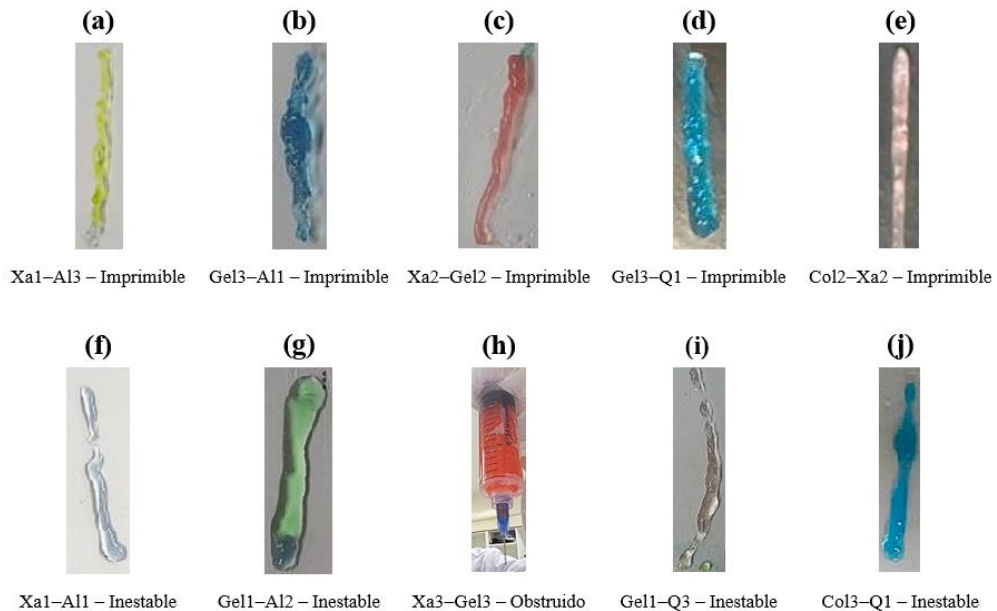


Figura 5.3: Fotografías de formulaciones extruibles (a–e) y no extruibles (f–j)

## 5.4 Análisis del desempeño operativo de los hidrogeles seleccionados mediante la parametrización de velocidad y presión en la plataforma CELLINK BIO-X

A partir de esta sección se presentan los resultados orientados a la verificación de la subfunción extrusión y solidificación, conforme a la metodología VDI 2206. Los datos obtenidos en esta etapa permitieron evaluar el comportamiento de los filamentos depositados a partir de las formulaciones seleccionadas bajo condiciones progresivas de presión y velocidad de impresión. Esta evaluación, realizada en la plataforma CELLINK BIO-X, tuvo como finalidad identificar una ventana operativa que garantizara la extrusión continua y homogénea de la biotinta, condición indispensable para su aplicación en impresiones de mayor complejidad geométrica. El flujo de análisis aplicado desde la captura fotográfica hasta la cuantificación del área depositada permitió confirmar patrones morfológicos característicos y establecer su relación con los gradientes de esfuerzo generados durante la extrusión.

En la Figura 5.4 se muestra el esquema representativo del proceso de análisis implementado. La captura inicial de los filamentos extruidos evidenció variaciones visibles en el grosor y la continuidad del material a lo largo del recorrido, directamente asociadas a los cambios programados en la velocidad de impresión y presión neumática. Al aplicar el procesamiento digital y la binarización de las imágenes, se logró aislar el área efectiva del filamento, resaltando las zonas de deposición incompleta o adelgazada que no resultan evidentes a simple vista.

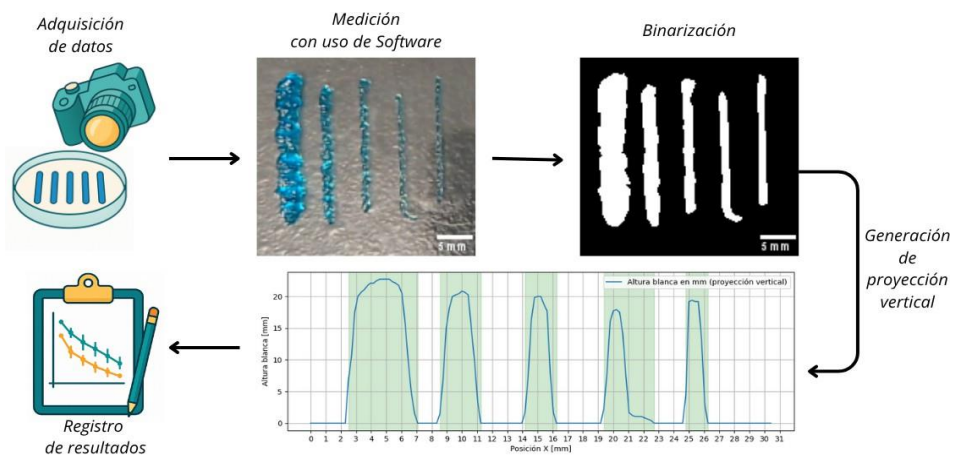


Figura 5.4: Diagrama de flujo del registro experimental.

La proyección vertical generada a partir de las imágenes binarizadas permitió cuantificar las variaciones de altura en función de la posición, revelando un patrón repetitivo: los picos de altura corresponden a segmentos donde el flujo de material fue estable, mientras que las depresiones marcadas indican regiones sometidas a mayor esfuerzo cortante, donde la deposición de material se reduce drásticamente. Este comportamiento se traduce en un trazo no uniforme que, de extrapolarse a contextos celulares, implicaría zonas de estrés mecánico variable. En el proceso de extrusión, el objetivo es mantener el esfuerzo cortante al mínimo posible, lo que se favorece con altas velocidades de desplazamiento y presiones reducidas para permitir la deposición en el medio de cultivo sin daño celular. Los esfuerzos mecánicos posteriores a la impresión son también relevantes, pero exceden el alcance de este trabajo.

Es importante señalar que las biotintas basadas en hidrogeles son sistemas no newtonianos (pseudoplásticos), cuya viscosidad disminuye progresivamente a medida que se incrementa la tasa de corte (41). En tanto se incrementa el esfuerzo cortante en la boquilla de extrusión, el material alcanza estados de menor viscosidad y se comporta de forma más cercana a un fluido, lo que abre la posibilidad de que otros fenómenos además del cortante influyan en la deposición. En este régimen, la tensión superficial puede afectar la cohesión y continuidad del filamento sobre el sustrato; la relación entre fuerzas viscosas e inerciales, aunque en régimen laminar (números de Reynolds bajos), puede condicionar la estabilidad del flujo; y la inestabilidad de Rayleigh-Plateau puede inducir adelgazamientos o rupturas periódicas en los filamentos extruidos. Estos mecanismos no se caracterizan en la presente tesis por estar fuera de su alcance experimental, pero reconocerlos permite comprender que el comportamiento de los hidrogeles bajo extrusión directa no depende únicamente del gradiente de esfuerzo, sino de la interacción acoplada de procesos reológicos e interfaciales.

El registro gráfico de los resultados (área promedio del filamento frente a la velocidad de impresión) presentado en las Figuras 5.5 a 5.22 confirmó esta tendencia consistente en todas las formulaciones evaluadas: a medida que la velocidad de impresión se incrementó, el área promedio del filamento depositado mostró una disminución progresiva. Este comportamiento se acentuó en configuraciones con presiones más altas, lo que refleja un mayor gradiente de cizallamiento en el interior del nozzle.

Si bien este efecto podría comprometer la homogeneidad del trazo, su identificación temprana permite ajustar de manera precisa la ventana operativa para cada biotinta, favoreciendo la continuidad y la reproducibilidad de la impresión. En particular, combinaciones como alginato-goma xantana (Figuras 5.11 y 5.13) y gelatina-goma xantana (Figura 5.6) mostraron un desempeño equilibrado.

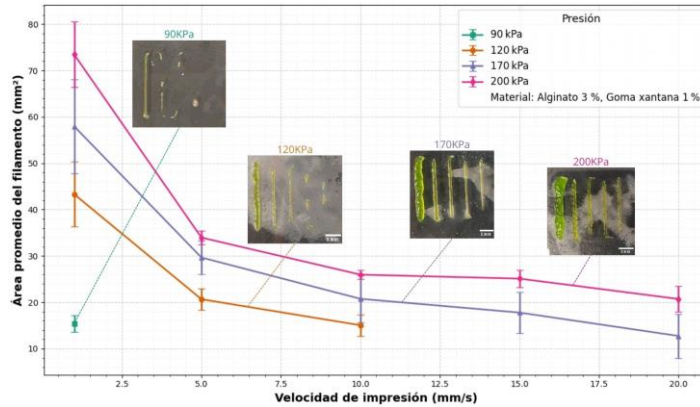


Figura 5.5: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Alginato 3 %, Goma xantana 1 %.

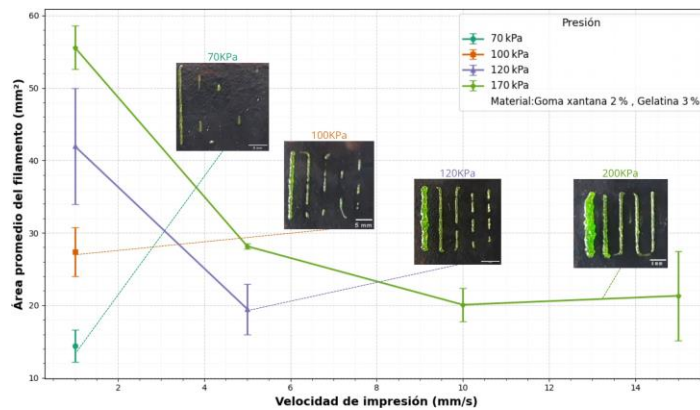


Figura 5.6: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Goma xantana 2 %, Gelatina 3 %.

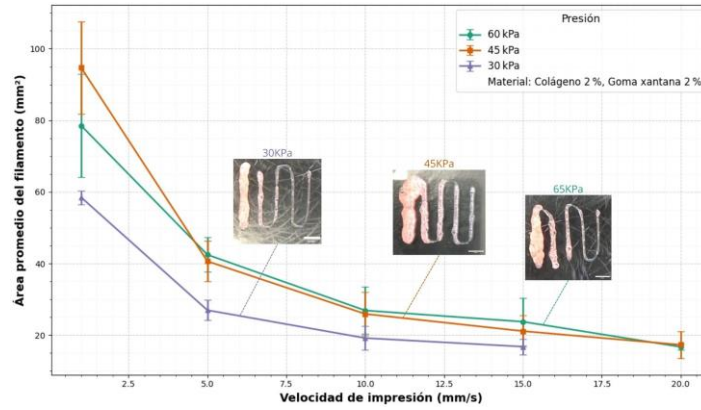


Figura 5.7: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Colágeno 2 %, Goma xantana 2 %.

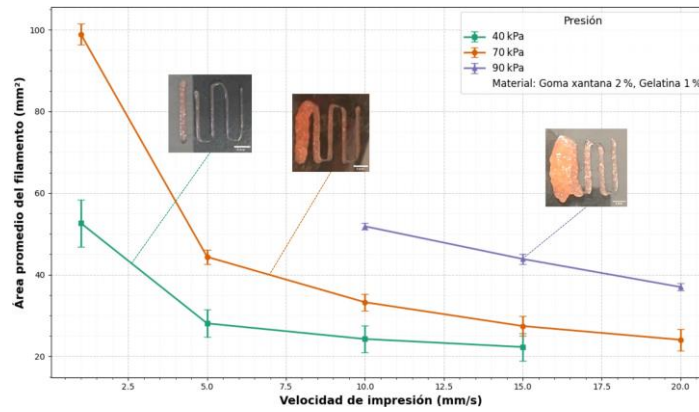


Figura 5.8: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Goma xantana 2 %, Gelatina 1 %.

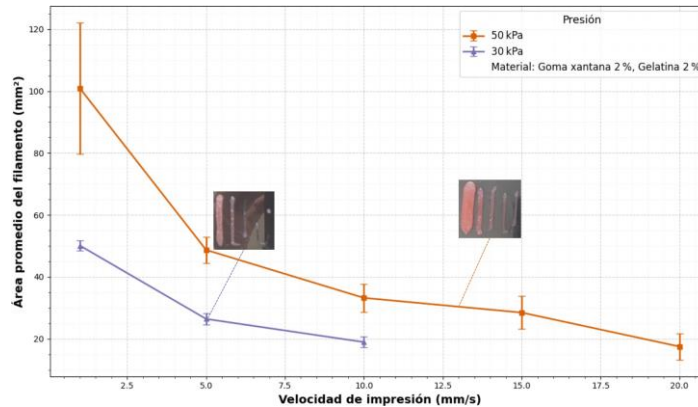


Figura 5.9: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes

presiones y velocidades de impresión. Formulación: Goma xantana 2 %, Gelatina 2 %.

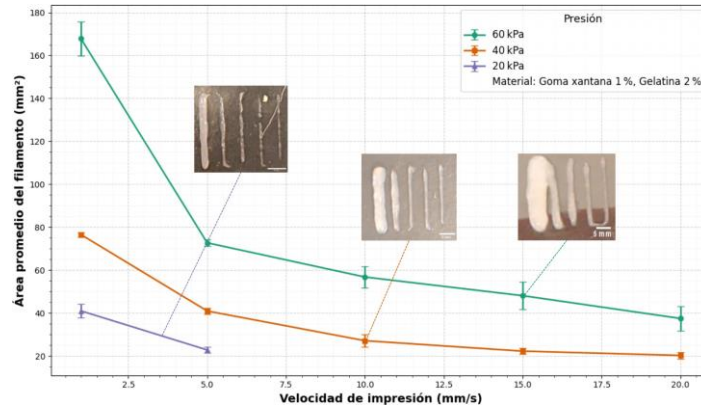


Figura 5.10: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Goma xantana 1 %, Gelatina 2 %.

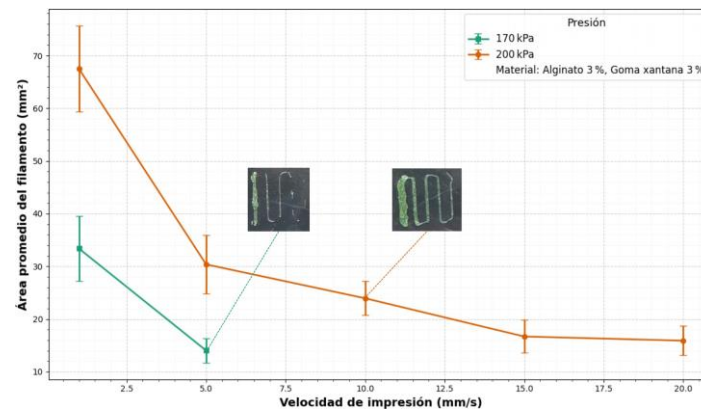


Figura 5.11: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Alginato 3 %, Goma xantana 3 %.

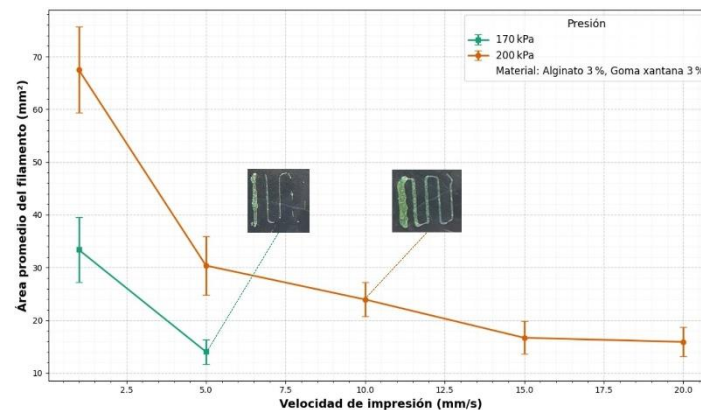


Figura 5.12: Comparación del área promedio del filamento extruido a 200 kPa en función de la velocidad de impresión. Formulación: Alginato 3 %, Goma xantana 3 %.

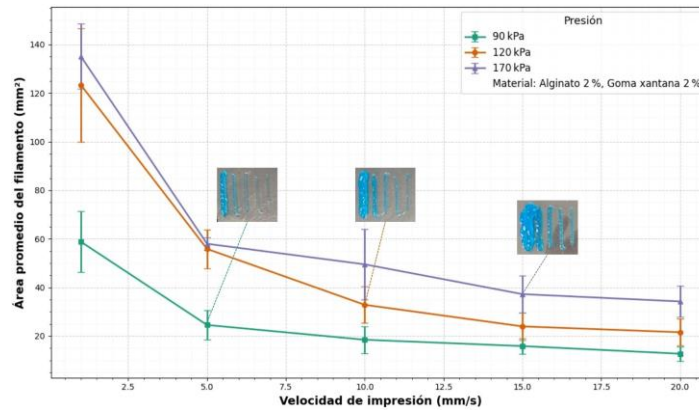


Figura 5.13: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Alginato 2 %, Goma xantana 2 %.

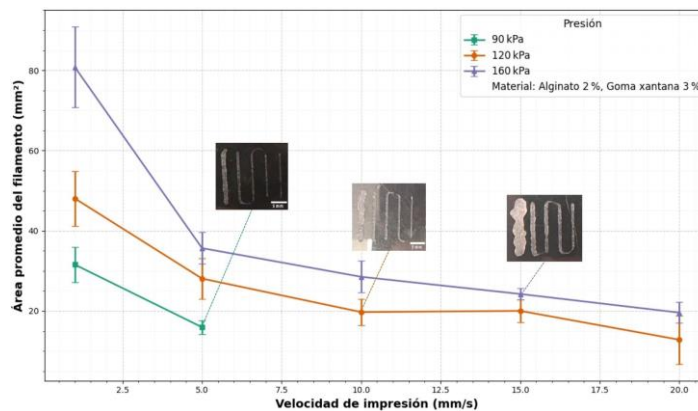


Figura 5.14: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Alginato 2 %, Goma xantana 3 %.

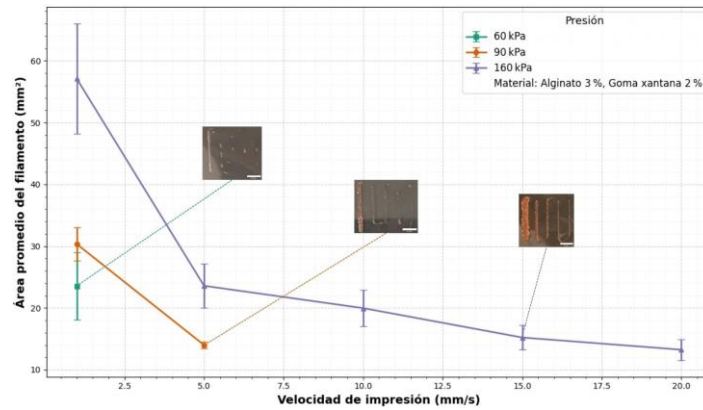


Figura 5.15: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Alginato 3 %, Goma xantana 2 %.

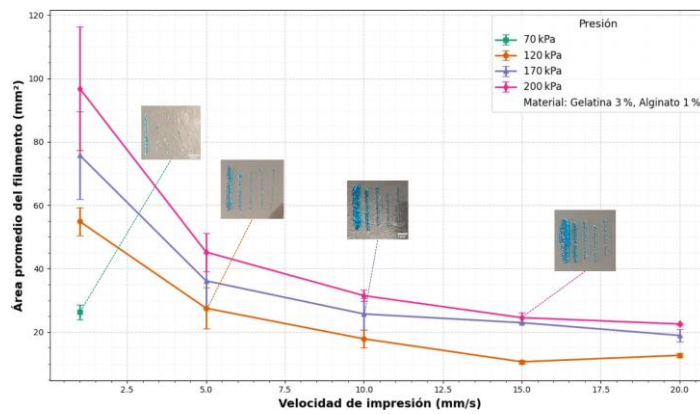


Figura 5.16: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Gelatina 3 %, Alginato 1 %.

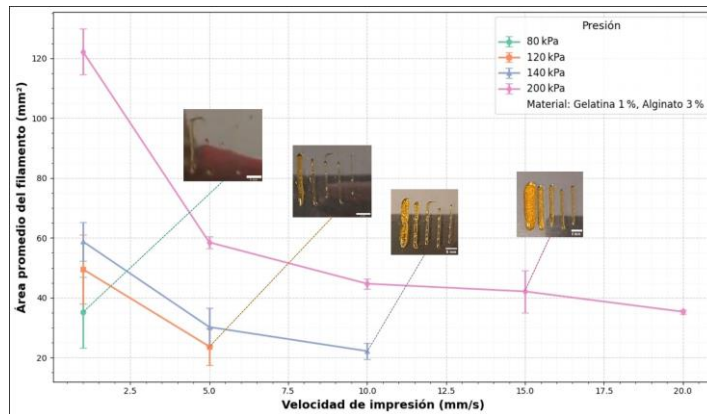


Figura 5.17: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Gelatina 1 %, Alginato 3 %.

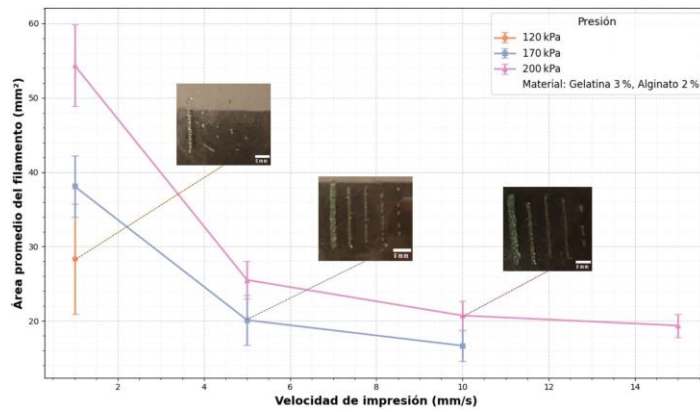


Figura 5.18: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Gelatina 3 %, Alginato 2 %.

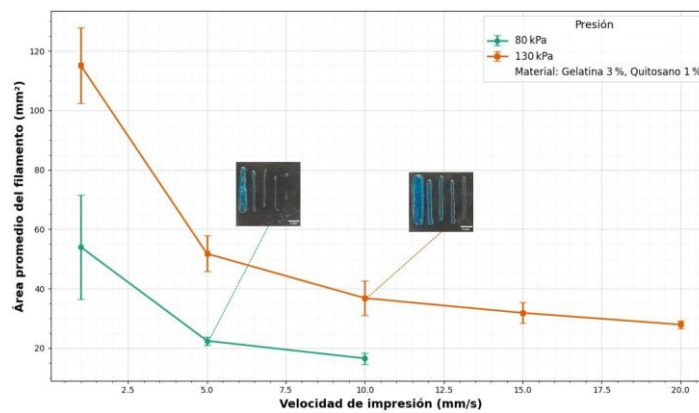


Figura 5.19: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Gelatina 3 %, Quitosano 1 %.

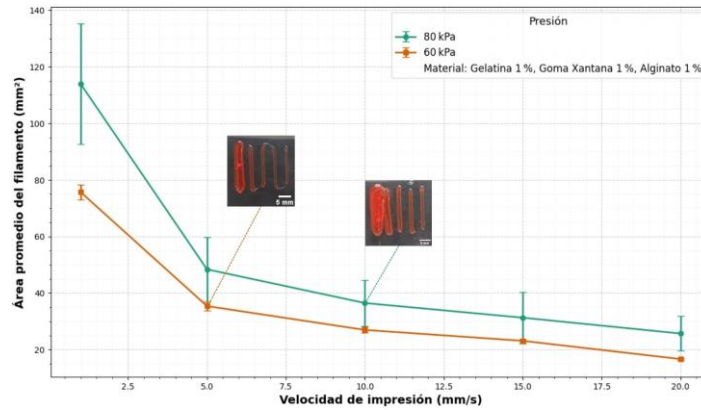


Figura 5.20: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Gelatina 1 %, Goma xantana 1 %, Alginato 1 %.

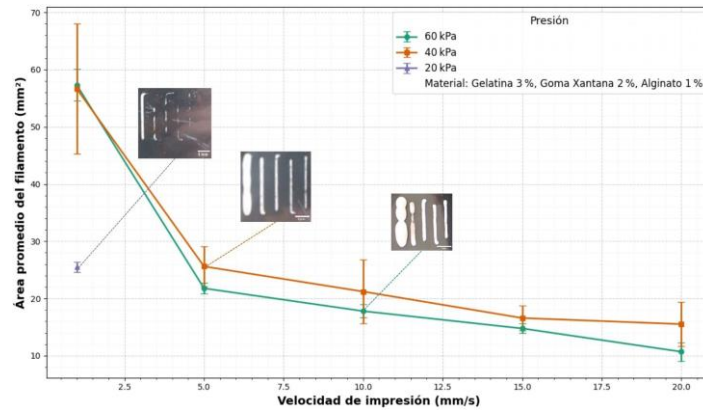


Figura 5.21: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes presiones y velocidades de impresión. Formulación: Gelatina 3 %, Goma xantana 2 %, Alginato 1 %.

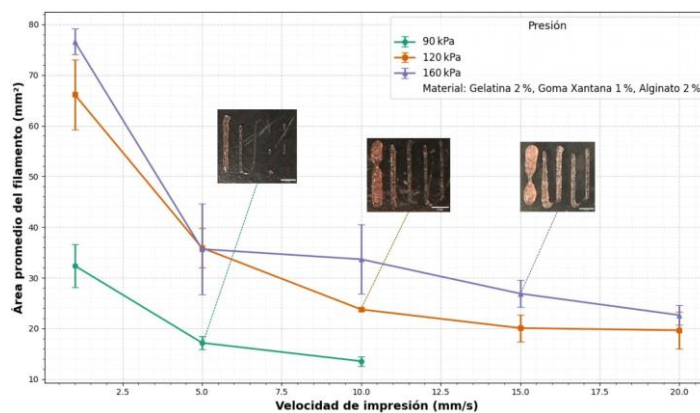


Figura 5.22: Comparación del área promedio del filamento extruido a diferentes

presiones y velocidades. Formulación: Gelatina 2 %, Goma xantana 1 %, Alginato 2 %.

La Figura 5.23 sintetiza el comportamiento de todas las formulaciones evaluadas para su uso directamente en la práctica, integrando en un solo diagrama los efectos de la velocidad y presión aplicada según la composición de la biotinta sobre el área promedio del filamento. Se observa que las áreas más amplias se concentran en condiciones de baja velocidad y presiones intermedias-altas, mientras que el incremento de velocidad produce una reducción marcada del área, evidenciando una menor deposición de material. Este patrón es particularmente notorio en mezclas con mayor contenido polimérico, las cuales, aunque mantienen cierta estabilidad estructural, requieren presiones más altas para ser extruidas de manera continua.

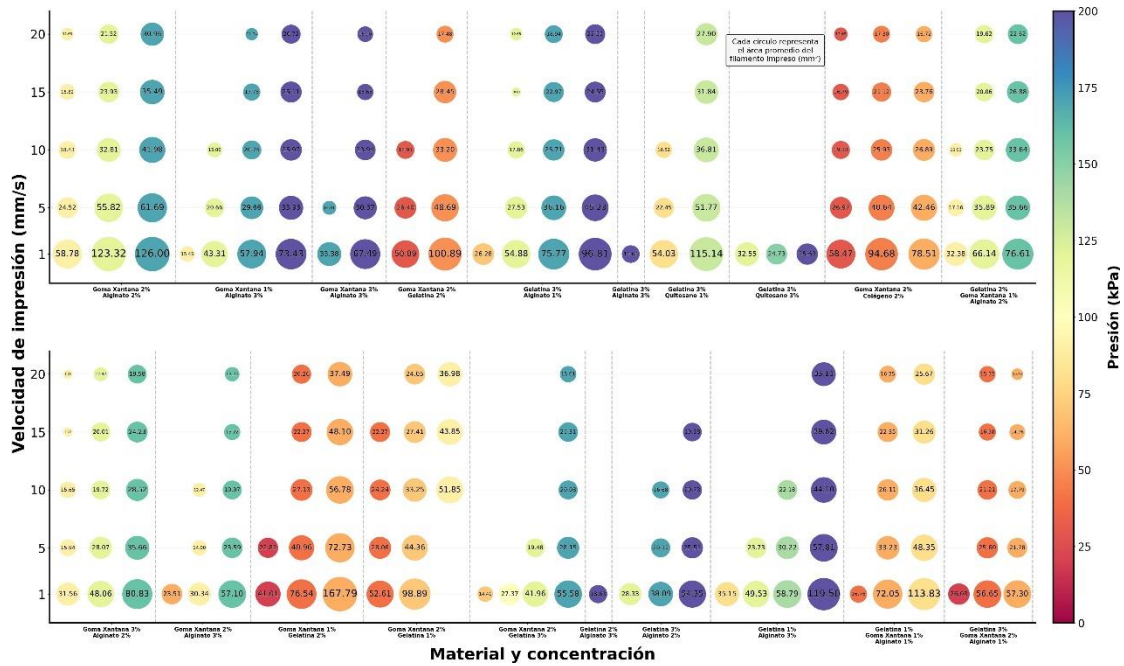


Figura 5.23: Diagrama de burbujas rotado 90° para máxima legibilidad. Relaciona la velocidad de impresión (mm/s) con diferentes formulaciones de biotintas (eje X), la presión aplicada (kPa, codificada en el color) y el área promedio del filamento impreso (mm<sup>2</sup>, proporcional al tamaño del círculo). Cada círculo representa el promedio de mediciones triplicadas en imágenes binarizadas del strand extruido. Este formato permite comparar con detalle la estabilidad de impresión entre materiales y condiciones operativas.

Dentro de estas formulaciones, la mezcla goma xantana 1 % – gelatina 2 % se distingue por su extrusión estable desde presiones cercanas a 20kPa, lo que sugiere una menor exposición a esfuerzos cortantes y, por ende, un mayor potencial para conservar la viabilidad celular. En contraste, las combinaciones gelatina 2 % – alginato 3 % y gelatina 3 % – alginato 3 % solo pudieron extruirse de manera aceptable a presiones cercanas a 200kPa y a la velocidad mínima evaluada (1mm/s), condición poco favorable para impresiones de gran escala debido al mayor tiempo de fabricación y al posible estrés adicional sobre las células.

Estas formulaciones, junto con gelatina 3 % – quitosano 3 %, fueron consideradas no aptas para continuar en las etapas siguientes del estudio. La Figura 5.24 muestra este comportamiento, evidenciando que, a pesar de alcanzar áreas de filamento similares (18–30mm<sup>2</sup>), la necesidad de presiones extremas compromete su aplicabilidad práctica y sugiere limitaciones importantes para su uso en bioimpresión funcional.

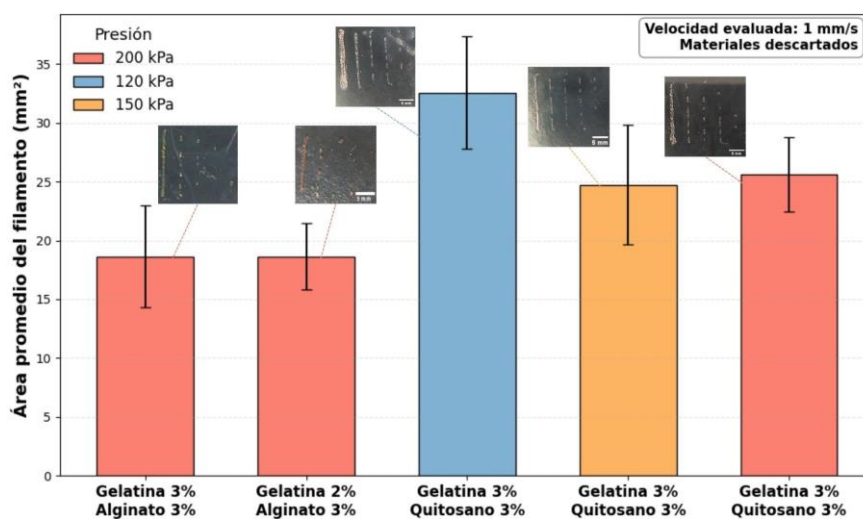


Figura 5.24: Comparación de mezclas descartadas evaluadas a 1 mm/s. Las formulaciones Gelatina 3 %–Alginato 3 %, Gelatina 2 %–Alginato 3 % y Gelatina 3 %–Quitosano 3 % solo lograron extruirse correctamente bajo presiones elevadas (120–200 kPa).

Por el contrario, los sistemas basados únicamente en goma xantana y alginato destacaron por su uniformidad y estabilidad estructural, atribuida

al entrecruzamiento rápido que provee el alginato, sin ofrecer sitios favorables para adhesión celular. Las combinaciones goma xantana – gelatina mostraron un equilibrio óptimo: estabilidad mecánica aportada por la goma xantana y sitios bioactivos en la gelatina. Finalmente, las mezclas ternarias que incorporan gelatina son las más prometedoras, combinando buena extrudabilidad, respuesta rápida al entrecruzamiento y potencial para aplicaciones biológicas complejas.

## **5.5 Evaluación de la estabilidad estructural inmediata**

Se valida la subfunción *solidificación y soporte* y se evalúa la capacidad de las formulaciones para conservar la geometría depositada inmediatamente post extrusión. Las mallas impresas fueron diseñadas con macroporos cuadrados de 1 a 5 mm<sup>2</sup>, siguiendo el patrón descrito en el Anexo 2. La fidelidad geométrica se cuantificó mediante el índice de precisión relativa (PR), calculado en ImageJ a partir del área y perímetro en la diagonal de cada macroporo. Además, la estabilidad se integró en un indicador robusto de desempeño estructural (IDE), que combina la cercanía del PR a la unidad con la variabilidad relativa, permitiendo discriminar precisión y consistencia.

Las Figuras 5.25 muestran ejemplos representativos de mallas donde se aprecian contrastes evidentes: en las formulaciones de mejor desempeño se distinguen bordes bien definidos y uniformidad entre macroporos, mientras que en condiciones subóptimas se observan fusiones parciales de hebras, irregularidades en los poros y heterogeneidad en la deposición.

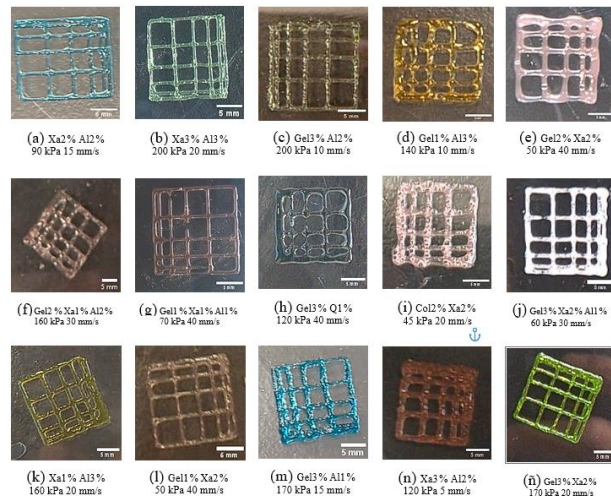


Figura 5.25: Mallas impresas para el ensayo de estabilidad estructural inmediata.

Posteriormente, los datos obtenidos de las mediciones fueron integrados en los mapas de calor presentados en las Figuras 5.26 y 5.27. El primer mapa muestra la media del PR y su desviación estándar, útil para identificar formulaciones cuya fidelidad geométrica se aproxima a la unidad; el segundo mapa consolida esta información en el indicador robusto (IDE), facilitando la comparación global del desempeño entre condiciones operativas.

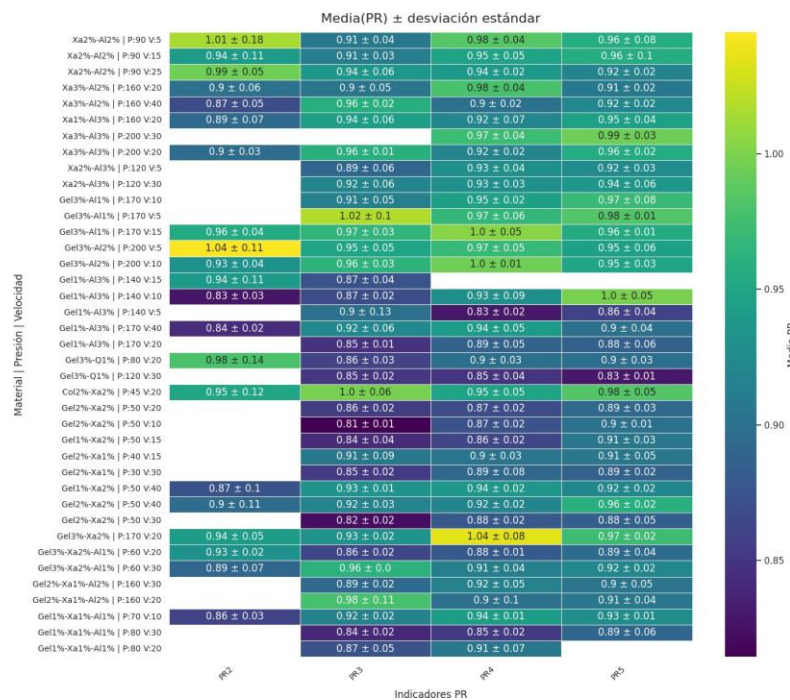


Figura 5.26: Mapa de calor de la media del índice PR (PR) con su

desviación estándar ( $\pm\sigma$ ) para las distintas combinaciones de material, presión y velocidad. Valores cercanos a 1 indican mayor fidelidad geométrica.

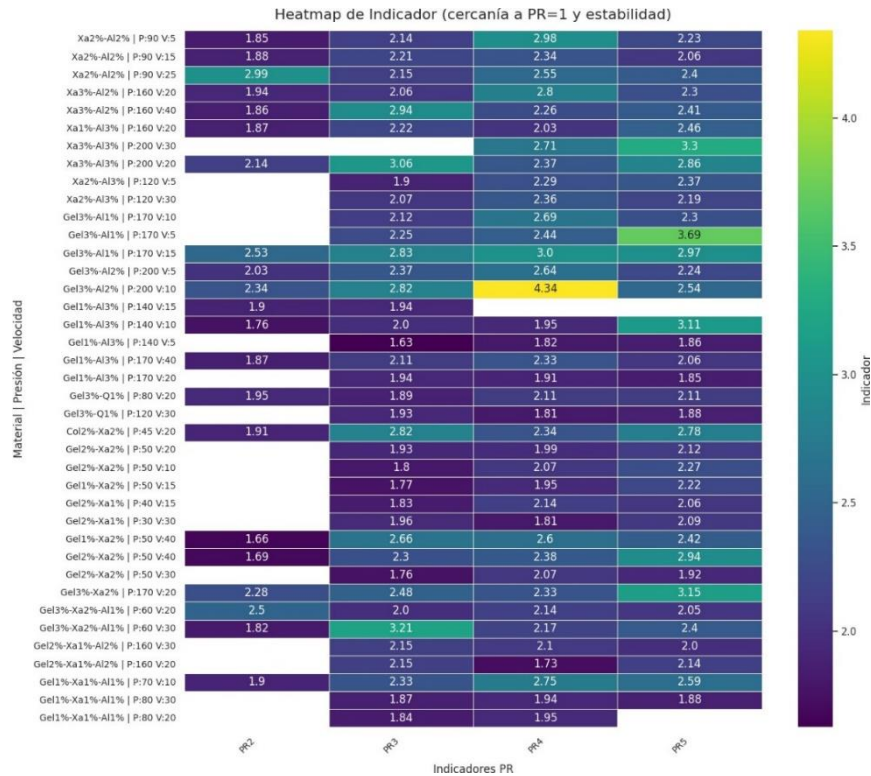


Figura 5.27: Mapa de calor del Índice de Desempeño Estructural (IDE), que combina la cercanía del PR a 1 y la variabilidad relativa.

Las formulaciones ternarias Gel–Xa–Al lograron el desempeño más equilibrado. En particular, la combinación Gel1 %–Xa1 %–Al1 % alcanzó valores de PR cercanos a la unidad, con alta consistencia reflejada en un IDE elevado. Estas condiciones las posicionan como candidatas para impresiones de geometrías anatómicas complejas o andamios multicapa. Las mezclas binarias Xa–Al mostraron fidelidad adecuada en macroporos grandes ( $PR \approx 0.99$ ), pero tendencia al colapso en poros pequeños ( $PR > 1.08$ ). En estos casos, el IDE moderado indica eficiencia en estructuras simples o en capas únicas, donde la variabilidad no compromete del todo la funcionalidad.

Por otro lado, las formulaciones con colágeno o quitosano, aunque alcanzaron PR aceptables (0.92-0.95), presentaron variabilidad mayor ( $IDE < 2.5$ ) y defectos en bordes, limitando su aplicabilidad directa. Sin

embargo, su biofuncionalidad inherente (adhesión celular y bioactividad) sugiere que, tras optimización reológica, podrían integrarse en sistemas híbridos para aplicaciones específicas en ingeniería de tejidos.

## 5.6 Evaluación del índice de colapso

Esta etapa constituye la última fase de verificación funcional dentro de la metodología VDI 2206, previa a la validación integral del sistema. El objetivo fue determinar la capacidad de las biotintas para mantener su forma al ser depositados sobre separaciones sin soporte de diferente longitud, simulando condiciones críticas para la fabricación de andamios biomédicos.

La Figura 5.28 presenta imágenes representativas ordenadas de acuerdo con el promedio del factor de colapso ( $C_f$ ), contrastando formulaciones con alta y baja estabilidad estructural. Se observa que las combinaciones más estables conservan la alineación y definición de los filamentos incluso en separaciones amplias, mientras que las menos estables muestran colapso evidente y pérdida de forma. Este contraste visual es un primer diagnóstico del comportamiento mecánico bajo creep post impresión de los hidrogeles y su potencial para aplicaciones biomédicas donde la precisión geométrica es crítica para la interconectividad y permeabilidad de los constructos.

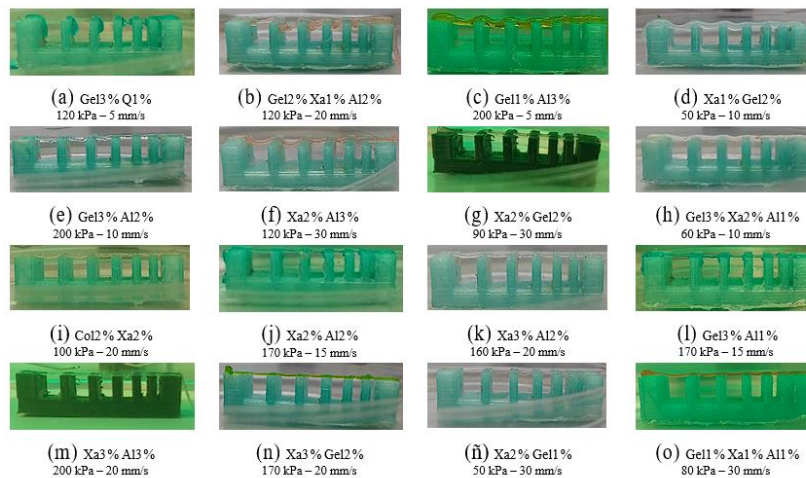


Figura 5.28: Imágenes representativas de las formulaciones ordenadas según su factor de colapso ( $C_f$ ). Tras esta evaluación visual, se analizaron

los datos cuantitativos del factor de colapso en función de las separaciones ensayadas (1–6 mm). La Figura 5.29 muestra que la mayoría de biotintas mantuvo deformaciones mínimas ( $C_f < 10\%$ ) en separaciones cortas (1–2 mm), mientras que a partir de 4 mm combinaciones superaron el 20 %, como Gel3 %-Q1 % y Gel3 %-Xa2 %-A11 %.

Por el contrario, las formulaciones con mayor proporción de alginato especialmente Gel1 %-Xa1 %-A11 % y Gel1 %-A13 % conservaron su geometría incluso en las separaciones más amplias ( $C_f < 5\%$ ).

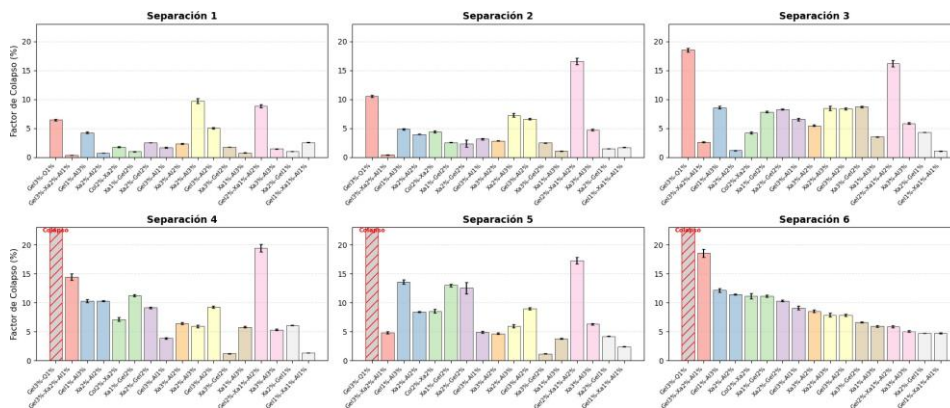


Figura 5.29: Factor de colapso (%) en separaciones de 1 a 6 mm. Se observa un incremento progresivo del colapso a mayores distancias, especialmente en biotintas con bajo contenido de alginato.

El análisis comparativo global resumido en la Figura 5.30 ordena las formulaciones de acuerdo con su promedio de  $C_f$  en todo el rango de separaciones por cada muestra. El ranking evidencia una clara jerarquía: Gel3 %-Q1 % se ubicó como la menos estable (promedios  $> 50\%$ ), mientras que Gel1 %-Xa1 %-A11 % y Gel1 %-A13 % mostraron un desempeño sobresaliente ( $\approx 5\%$ ). Las formulaciones binarias ocuparon posiciones intermedias, sugiriendo que estas mezclas ternarias proporcionan un balance superior entre cohesión y rigidez como tinta de biomaterial prometedora.

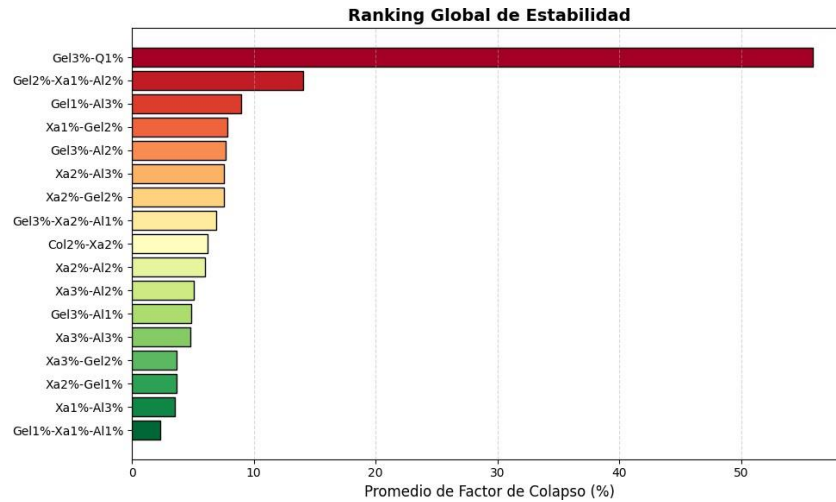


Figura 5.30: Ranking global de estabilidad estructural en base al promedio del factor de colapso ( $Cf$ ) para todas las separaciones. Las formulaciones ternarias con alginato mostraron el mejor desempeño.

Estos resultados refuerzan la idea de que, aunque varias formulaciones pueden emplearse para impresiones simples o monocapa, solo aquellas con bajo  $Cf$  y comportamiento consistente frente a separaciones amplias son candidatas para estructuras biomédicas complejas, donde el soporte mecánico inicial es crucial para mantener la arquitectura del andamio durante el proceso de bio fabricación y posterior cultivo celular.

## 5.7 Validación final mediante impresión de un modelo anatómico complejo

La fase de validación final marcó el cierre del modelo metodológico planteado, al trasladar las condiciones optimizadas desde pruebas controladas hacia un escenario anatómico complejo. Esta etapa permitió evaluar, en un solo proceso, la capacidad de las biotintas híbridas seleccionadas para mantener la precisión geométrica y la estabilidad estructural en piezas con curvaturas pronunciadas y detalles finos, características propias de órganos como el pabellón auricular o la nariz. Más allá de verificar la imprimibilidad, este ejercicio buscó evidenciar el

potencial de las formulaciones para su uso en andamios personalizados y modelos fármaco-toxicológicos.

La Figura 5.31 muestra la impresión progresiva del modelo anatómico de nariz empleando la formulación Gel1 %-Xa1 %-Al1 %, seleccionada por su desempeño superior en las métricas estructurales obtenidas previamente (IDE elevado, factor de colapso bajo, PR cercano a 1 y bajo rango de presiones de trabajo). Durante la deposición, se observó una buena continuidad del filamento y una adecuada fidelidad geométrica en las diferentes etapas del proceso (10-100 % de la construcción). Posteriormente, el entrecruzamiento en  $\text{CaCl}_2$  100mM permitió consolidar el constructo, evidenciando su rápida respuesta iónica y alta capacidad autoportante, sin deformaciones significativas al ser manipulado. Estos resultados confirman el potencial de esta formulación como la más prometedora del conjunto evaluado para la fabricación de geometrías anatómicas complejas y su proyección hacia aplicaciones en ingeniería de tejidos.

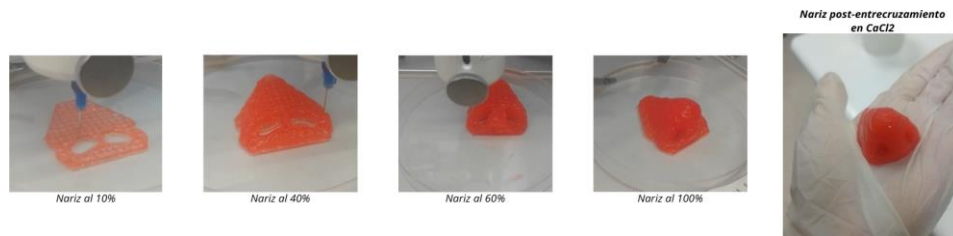


Figura 5.31: Impresión del modelo anatómico de nariz en distintas etapas de avance (10 %, 40 %, 60 %, 100 %) y post-entrecruzamiento en  $\text{CaCl}_2$ . Material utilizado: Gel1 %-Xa1 %-Al1 %.

De manera complementaria, la Figura 5.32 presenta la impresión del modelo utilizando la formulación Xa3 %-Al2 % caracterizada por un bajo promedio de factor de colapso, un IDE elevado y valores de PR inferiores a la unidad, demostró un comportamiento altamente estable durante la deposición. Si bien su procesamiento requirió un rango de presiones mayor en comparación con Gel1 %-Xa1 %-Al1 %, el constructo final mantuvo una geometría definida y una adecuada

continuidad de filamentos, alcanzando un acabado morfológico uniforme y sin colapsos notables al finalizar la impresión. Estos resultados confirman que, pese a la mayor exigencia operativa, esta formulación es igualmente apta para generar modelos anatómicos robustos y precisos.



Figura 5.32: Impresión del modelo anatómico de nariz en distintas etapas de avance (10 %, 50 %, 80 %, 90 % y 100 %) utilizando la formulación Xa3 %–A12 %.

La Figura 5.33 presenta la impresión del modelo anatómico de pabellón auricular utilizando la formulación Gel4 %–Xa2 %. Esta mezcla, si bien requirió un rango de presiones de trabajo más elevado para alcanzar una deposición continua y estable, demostró un Índice de Desempeño Estructural (IDE) alto, con valores de PR cercanos a la unidad y un factor de colapso reducido. Estas características se tradujeron en una construcción con buena definición volumétrica y conservación de la geometría durante el proceso de apilamiento de capas.

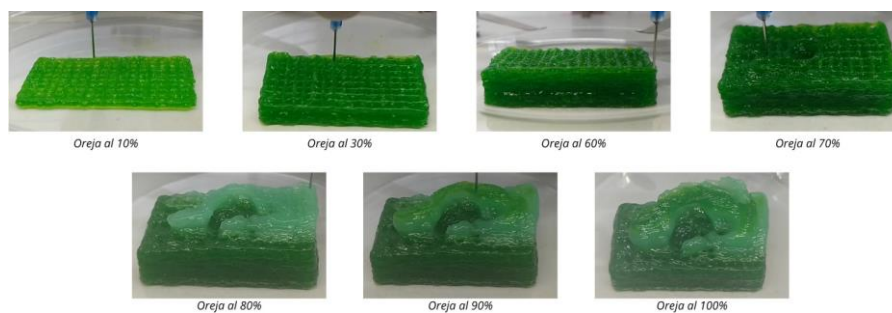


Figura 5.33: Impresión del modelo anatómico de oreja en distintas etapas de avance (10 %, 30 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 %) utilizando la formulación Gel3 %–Xa2 %.

Se evaluó la formulación Gel1 %–A13 % en la impresión del modelo auricular (Figura 5.34). Esta mezcla, aunque presentó un PR cercano a 0.8 y

un IDE aceptable en los análisis previos, mostró un factor de colapso elevado que limitó su capacidad de mantener la geometría a medida que aumentaba la altura del constructo. En las primeras capas se observó cierta regularidad, pero conforme se añadieron capas sucesivas, el modelo evidenció deformación y fusión de hebras, comprometiendo su fidelidad geométrica. Este comportamiento indica que, aunque puede emplearse en andamios planos o de baja altura, no resulta adecuada para geometrías anatómicas tridimensionales complejas sin optimización adicional.

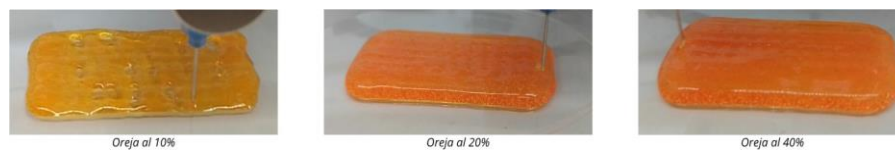


Figura 5.34: Modelo auricular impreso con Gel1 %–Al3 %. A pesar de un IDE aceptable y PR cercano a 0.8, el elevado factor de colapso ocasionó deformación progresiva en las capas superiores, limitando su aplicabilidad en geometrías volumétricas complejas.

Finalmente, la validación con modelos anatómicos cerró el ciclo metodológico planteado en VDI 2206. Al integrar los parámetros y métricas definidos en cada fase previa, se comprobó que el proceso permite transitar de pruebas elementales hacia geometrías complejas manteniendo control sobre estabilidad y fidelidad. Este resultado confirma la solidez del enfoque propuesto para escalar la bioimpresión hacia el diseño avanzado de modelos fisiológicos.

## VI. Discusión

La presente investigación demostró la factibilidad de adaptar el modelo VDI 2206 al desarrollo y validación acelerada de biotintas híbridas, priorizando desde el inicio las subfunciones críticas definidas por Rau et al. (10, 11): extrusión continua, solidificación inmediata y soporte estructural. Este enfoque funcional permitió establecer un filtro temprano que garantizó la estabilidad geométrica básica de las formulaciones antes de avanzar hacia etapas más complejas, reduciendo la dependencia de

procesos iterativos extensos y evitando evaluar biofuncionalidad en materiales estructuralmente inviables. A diferencia del trabajo original de Rau et al., enfocado en siliconas y elastómeros de alta viscosidad, en este estudio se trasladaron y ajustaron dichas subfunciones a biotintas poliméricas híbridas con requisitos biológicos y de esterilidad, ampliando así su aplicabilidad hacia biomateriales y demostrando que el enfoque VDI 2206 es versátil para sistemas blandos y bioactivos.

Una vez definido el *toolbox* polimérico y superado el primer filtrado funcional, la investigación se enfocó en la optimización de parámetros operativos (presión y velocidad de impresión). Este paso fue esencial para aislar el desempeño intrínseco de cada formulación y minimizar el sesgo asociado a condiciones de impresión subóptimas. En comparación con estudios previos (7, 43, 52), aquí se logró que con presiones bajas y controladas fuese posible reproducir geometrías complejas con más del 80 % de fidelidad geométrica en un solo paso.

Con las condiciones operativas establecidas, la evaluación estructural se consolidó mediante dos métricas complementarias: el índice de precisión relativa (PR), comúnmente utilizado en la literatura (50, 60, 69), y el Índice de Desempeño Estructural (IDE) propuesto. El primero cuantificó la fidelidad geométrica en función del área y perímetro de los macroporos, mientras que el segundo integró simultáneamente precisión y variabilidad, permitiendo jerarquizar formulaciones de manera más robusta. Ribeiro et al. (2017) y Ouyang et al. (2016) se centraron en la circularidad y fidelidad de forma con PR en sistemas mono componente, mientras que este trabajo optimizó ese enfoque para comparación directa de múltiples formulaciones híbridas, introduciendo IDE como una herramienta integradora. Este IDE supera la limitación de evaluar una sola capa y puede extenderse a análisis multicapa, evaluando así la capacidad autoportante bajo condiciones más exigentes. Además, el IDE permitió cuantificar diferencias de variabilidad Inter lote, aportando información estadística valiosa que PR por sí sólo no capturaba.

A diferencia de las pruebas reológicas convencionales, que requieren

equipamiento especializado (p. ej., reómetros rotacionales) y personal altamente capacitado para la interpretación de curvas de viscosidad, módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ), el enfoque implementado en este estudio se basó en parámetros obtenidos directamente de la bioimpresora (presión de extrusión, velocidad de desplazamiento, distancia entre filamentos y deformación de macroporos). Este tipo de métricas operativas extraídas en tiempo real del equipo de impresión permiten evaluar la estabilidad geométrica y la capacidad autoportante sin necesidad de realizar un barrido reológico completo para cada formulación. En entornos clínicos o laboratorios con recursos limitados, donde es inviable contar con reómetros por su alto costo y la necesidad de experiencia técnica avanzada, esta metodología ofrece una alternativa reproducible y directamente vinculada al proceso de impresión (9). De hecho, los resultados obtenidos mostraron que al controlar la presión y velocidad directamente desde el gcode permitió estandarizar directamente por medio de parámetros reportados por la propia bioimpresora y fue posible jerarquizar al menos 12 formulaciones distintas en términos de estabilidad geométrica y reproducibilidad estructural. Esta estrategia reduce la brecha entre caracterización de laboratorio y condiciones reales de bioimpresión, integrando el desempeño reológico efectivo (comportamiento viscoelástico bajo flujo) con la respuesta estructural final. En consecuencia, el IDE propuesto no sólo complementa los módulos reológicos tradicionales, sino que los traduce a un marco operativo más cercano a la práctica de impresión tridimensional, favoreciendo así la adopción de biotintas optimizadas en entornos clínicos y productivos donde los reómetros no están disponibles.

Gillispie et al. (2020) demostraron la utilidad del factor de colapso como métrica adicional de estabilidad estructural (60). Siguiendo esa línea, en este estudio se sistematizó el cálculo de dicho factor y se obtuvieron valores incluso superiores en reproducibilidad, al integrar un protocolo de impresión parametrizado y un filtrado funcional previo de formulaciones. Esto resalta la ventaja de aplicar un marco metodológico modular que reduce la variabilidad antes de la medición y complementa la propuesta

de Gillispie con un abordaje comparativo más amplio, validado con 48 impresiones en triplicado por formulación. Esta cantidad de repeticiones otorgó potencia estadística suficiente para detectar diferencias sutiles entre composiciones muy cercanas.

Materiales como gelatina mostraron mayor variabilidad atribuible probablemente a su termosensibilidad. Esta característica, influenciada por fluctuaciones de temperatura ambiental durante los ensayos, pudo contribuir a discrepancias entre repeticiones en días distintos (70), subrayando la importancia de contar con control térmico y evaluación interlote para asegurar comparabilidad de resultados.

Pese a cumplir los objetivos planteados como optimización estructural, jerarquización y validación mediante modelos anatómicos complejos, la investigación se limitó a la estabilidad inmediata. Normas como la ISO 10993 (71) y la ASTM F3659-24 (56) establecen que una biotinta debe ser evaluada adicionalmente en citotoxicidad, adhesión, proliferación celular, degradación y comportamiento mecánico a largo plazo, lo que marca una frontera clara entre los logros de este estudio y las evaluaciones pendientes para validar completamente las biotintas desarrolladas.

## **6.1 Recomendaciones para trabajos futuros**

A la luz de los resultados obtenidos y de las limitaciones identificadas, se propone una agenda de investigación orientada a consolidar y ampliar el marco metodológico desarrollado. En primer lugar, es prioritario extender los rangos de presión, velocidad y temperatura de impresión para capturar comportamientos viscoelásticos no lineales y definir ventanas específicas para cada formulación. Este tipo de evaluación debería incluir también sistemas multicapa y multiextrusor para simular escenarios de impresión complejos y validar la capacidad autoportante de las biotintas en condiciones más exigentes. Asimismo, debe complementarse la evaluación estructural inmediata con estudios de biofuncionalidad a largo plazo citocompatibilidad, adhesión y

proliferación celular, degradación controlada y caracterización mecánica en condiciones fisiológicas siguiendo normas internacionales como ISO 10993 y ASTM F3659-24.

En segundo lugar, la integración de técnicas ópticas avanzadas para el monitoreo en tiempo real de la extrusión y solidificación, inspiradas en la propuesta de Lamberger et al. (2024) (52), permitiría reducir la variabilidad interensayo y habilitar un control estadístico continuo del proceso. Este tipo de sistemas podría también retroalimentar algoritmos de control activo, ajustando presión o velocidad en función de la calidad geométrica detectada in situ.

Un tercer eje estratégico es el desarrollo de arquitecturas multicapa y multicomponente tipo “sándwich” que integren gradientes de rigidez o bioactividad, evaluando propiedades de barrera, permeabilidad transepitelial y polarización celular en modelos epiteliales complejos. Esta línea permitirá probar la metodología VDI 2206 en contextos fisiológicos más realistas y acercarse a modelos funcionales de tejidos (72).

Finalmente, la base de datos generada en este estudio constituye un punto de partida sólido para el desarrollo de estrategias basadas en inteligencia artificial orientadas a la predicción y optimización de parámetros de impresión en tiempo real. En particular, modelos de aprendizaje automático en reología y bioimpresión como los propuestos por Daegeon Oh et al. (48) podrían entrenarse con estos datos para anticipar el comportamiento estructural de nuevas formulaciones y minimizar la dependencia de ensayos experimentales extensivos. Esta aproximación no pretende sustituir técnicas consolidadas como la reometría considerada una herramienta de referencia en la optimización de biotintas y que requiere personal especializado para su correcta interpretación (9, 73) sino complementarlas dentro del ciclo de desarrollo. De este modo, se favorecería una iteración más ágil hacia biotintas personalizadas y ajustadas a los requerimientos específicos en el diseño de modelos fisiológicos.

## **Disponibilidad de datos**

Los conjuntos de datos generados, utilizados y/o analizados durante el presente estudio están disponibles a través del autor previa solicitud razonable.

## **Declaración sobre la elaboración y revisión del manuscrito**

Se utilizó la herramienta de inteligencia artificial ChatGPT (OpenAI) como apoyo para la corrección de estilo, esquemas y revisión gramatical del presente documento. Todas las ideas, análisis y planteamientos científicos presentados son originales del autor. Cualquier contenido conceptual o bibliográfico proveniente de terceros ha sido debidamente citado conforme a las normas académicas correspondientes.

## **VII. Conclusiones**

La presente investigación demostró la viabilidad de adaptar el modelo metodológico VDI 2206 para el desarrollo y validación estructural temprana de biotintas híbridas empleadas en bioimpresión 3D por extrusión. En concordancia con los objetivos específicos planteados, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. En relación con el diseño del *toolbox* de hidrogeles híbridos (alginato, goma xantana, gelatina, colágeno y quitosano), se logró desarrollar y caracterizar un conjunto amplio de formulaciones que permitió organizar sus propiedades estructurales relevantes y sentar las bases para una selección racional según su comportamiento estructural.
2. Respecto a la caracterización de la extrusión inicial, se realizó un filtrado rápido mediante dispensación manual controlada, descartando formulaciones incapaces de mantener deposición estable. Este paso optimizó el uso de recursos y concentró el análisis en materiales con potencial real de impresión.

3. En lo referente al análisis del desempeño operativo, se estableció un rango reproducible de presión y velocidad en la plataforma CELLINK BIO-X a través de impresiones controladas con G-code parametrizado. Este control permitió cuantificar objetivamente el comportamiento de cada formulación durante la extrusión y sentó las bases para su jerarquización posterior.
4. Para la evaluación de la estabilidad estructural inmediata, se implementaron métricas estructurales complementarias el Índice de Precisión Relativa (PR) y el Índice Combinado de Desempeño Estructural (IDE) que integraron precisión geométrica y variabilidad en un criterio objetivo para priorizar formulaciones. Esta evaluación se reforzó mediante el ensayo de colapso, que aportó información sobre la capacidad autoportante de las biotintas y permitió correlacionar sus resultados, consolidando una validación estructural más robusta y comparativa entre formulaciones binarias y ternarias.
5. La impresión de modelos anatómicos complejos confirmó la capacidad de las biotintas priorizadas para mantener estabilidad estructural y reproducibilidad geométrica, consolidando su validación funcional inicial.

## VIII. Referencias Bibliográficas

1. Reddy VS et al. “Contemporary standpoint and future of 3D bioprinting in tissue/organs printing”. *Current Opinion in Biomedical Engineering*. 2023; 27: 100461. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2023.100461>.
2. A M D Silva et al. “Global legislation regulating the donation, procurement and distribution processes of organs and tissues from deceased donors for transplants: A scoping review”. *Heliyon*. 2024; 10(4): e26313. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26313>.
3. Neciosup Salcedo CE. La donación de órganos y tejidos en el Perú. Inf. téc. Presentación técnica ante la Comisión de Salud y Población del Congreso de la República del Perú; 11 septiembre 2018. Lima, Perú: Ministerio de Salud del Perú, 2018. Available from: [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con5\\_uibd.nsf/FE22C6CCDCE499B505258330007B40DE/\\\$FILE/DONACI%C3%93N-%C3%93RGANOS-TEJIDOS-PER%C3%9A.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con5_uibd.nsf/FE22C6CCDCE499B505258330007B40DE/\$FILE/DONACI%C3%93N-%C3%93RGANOS-TEJIDOS-PER%C3%9A.pdf).
4. Caceres-Alban J, Sanchez M y Casado FL “Bioprinting: A strategy to build informative models of exposure and disease”. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*. 2023; 16: 594-610. Available from: <https://doi.org/10.1109/RBME.2022.3146293>.
5. Copus J, Lee SJ y Atala A. “Bioink printability methodologies for cell-based extrusion bioprinting”. En: *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Ed. por Zhang LG, Fisher JP y Leong KW. 2nd ed. Academic Press, 2022, 153-183. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824552-1.00013-X>.
6. Sean V Murphy y Anthony Atala “3D bioprinting of tissues and organs”. *Nature Biotechnology*. 2014; 32(8): 773-785. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>.
7. Sergio C. Pedroza-González et al. “Bioinks for 3D Bioprinting: A Scientometric Analysis of Two Decades of Progress”. *International Journal of Bioprinting*. 2021; 7(2): 333. Available from: <https://doi.org/10.18063/ijb.v7i2.337>.
8. O’Connell CD and Dalton PD and Hutmacher DW “Why

- bioprinting in regenerative medicine should adopt a rational technology readiness assessment”. *Trends in Biotechnology*. 2024; 42(10): 1218-1229. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2024.03.006>.
9. Torres-Ayala LK, Nakamatsu J y Kim S “Rheological optimization of hybrid alginate–xanthan gum hydrogels for enhanced 3D bioprinting fidelity”. *Polymer Bulletin*. 2025; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00289-025-05923-z>.
  10. Rau DA, Williams CB y Bortner MJ “Rheology and printability: A survey of critical relationships for direct ink write materials design”. *Progress in Materials Science*. 2023; 140: 101188. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2023.101188>.
  11. Rau DA, Bortner MJ y Williams CB “A rheology roadmap for evaluating the printability of material extrusion inks”. *Additive Manufacturing*. 2023; 75: 103745. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addma.2023.103745>.
  12. D’Cunha P, Pande B, Kathalagiri MS, Moharana AK, S DT, Pinto CS “Absorbable sutures: chronicles and applications”. *International Surgery Journal*. 2022; 9(7): 1383-1394. Available from: <https://doi.org/10.18203/2349-2902.isj20221733>.
  13. Mark JE, ed. *Physical Properties of Polymers Handbook*. 2.<sup>a</sup> ed. New York: Springer, 2007, 1076. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-69002-5>.
  14. Maitz MF “Applications of synthetic polymers in clinical medicine”. *Biosurface and Biotribology*. 2015; 1(3): 161-176. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.002>.
  15. Lím D Wichterle O “Hydrophilic gels for biological use”. *Nature*. 1960; 185(4706): 117-118. Available from: <https://doi.org/10.1038/185117a0>.
  16. Hoffman AS “Hydrogels for biomedical applications”. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64: 18-23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010>.
  17. Jeffrey Hrkach y Robert Langer “From micro to nano: evolution and impact of drug delivery in treating disease”. *Drug Delivery and Translational Research*. 2020; 10(3): 567-570. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00769-6>.

18. William C Jr Wilson y Thomas Boland “Cell and organ printing 1: protein and cell printers”. *Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. 2003; 272(2): 491-496. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.a.10057>.
19. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR “Organ printing: Tissue spheroids as building blocks”. *Biomaterials*. 2009; 30(12): 2164-2174. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.084>.
20. Hak-Joon Kang et al. “A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity”. *Nature Biotechnology*. 2016; 34(3): 312-319. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt.3413>.
21. Kolesky DB, Truby RL, Gladman AS, Busbee TA, Homan KA, Lewis JA “3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs”. *Adv Mater*. 2014; 26(19): 3124-3130. Available from: <https://doi.org/10.1002/adma.201305506>.
22. Debapriya Choudhury, Sharav Anand y May Win Naing “The arrival of commercial bioprinters – Towards 3D bioprinting revolution!” *International Journal of Bioprinting*. 2018; 4(2): 139. Available from: <https://doi.org/10.18063/IJB.v4i2.139>.
23. Eneko Axpe y Michelle L Oyen “Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting”. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17(12): 1976. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms17121976>.
24. Tronci G, Doyle A, Russell SJ, Wood DJ “Triple-helical collagen hydrogels via covalent aromatic functionalisation with 1,3-phenylenediacetic acid”. *J Mater Chem B*. 2013; 1: 5478-5488. Available from: <https://doi.org/10.1039/C3TB20218F>.
25. Rui-Lin Pan et al. “Systematic review on the application of 3D-bioprinting technology in orthoregeneration: current achievements and open challenges”. *Journal of Experimental Orthopaedics*. 2022; 9(1): 95. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40634-022-00518-3>.
26. Croisier F, Jérôme C “Chitosan-based biomaterials for tissue engineering”. *European Polymer Journal*. 2013; 49(4): —. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>.
27. Roya Abka-Khajouei et al. “Structures, Properties and Applications of

- Alginates”. *Marine Drugs*. 2022; 20(6): Available from: <https://doi.org/10.3390/md20060364>.
28. T B May et al. “Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients”. *Clinical Microbiology Reviews*. 1991; 4(2): 191-206. Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.4.2.191>.
  29. Devara Venkata Krishna, Mamilla Ravi Sankar “Extrusion based bioprinting of alginate based multicomponent hydrogels for tissue regeneration applications: State of the art”. *Materials Today Communications*. 2023; 35: 105696. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.105696>.
  30. Lu, S., Na, K., Wei, J., Zhang, L., Guo, X. “Alginate oligosaccharides: The structure-function relationships and the directional preparation for application”. *Carbohydrate Polymers*. 2022; 284: 119225. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119225>.
  31. Hoque ME Rashid AB Showva N-N “Gelatin-based scaffolds: An intuitive support structure for regenerative therapy”. *Current Opinion in Biomedical Engineering*. 2023; 26: 100452. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2023.100452>.
  32. Geonzon L.C., Hayano Y., Takagi H., Takatsuno K., Nitta Y., Mayumi K., Matsukawa S. “Gelation mechanism and network structure of mixed cold-water fish gelatin and pork skin gelatin elaborated at the molecular level”. *Food Hydrocolloids*. 2025; 168: 111535. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.111535>.
  33. C Antich et al. “Bioprinting spatially guided functional 3D neural circuits with agarose-xanthan gum copolymer hydrogels”. *Biomaterials*. 2025; 318: 123156. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2025.123156>.
  34. Han SS Kumar A Kummara Madhusudana Rao “Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review”. *Carbohydrate Polymers*. 2018; 180: 128-144. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.009>.
  35. Afra S, Samadi A, Asadi P, Bordbar M, Iloukhani M, Rai A, Aghajanpour M “Chitosan crosslinkers and their functionality in 3D bioprinting to produce chitosan-based bioinks”. *Inorganic Chemistry*

- Communications. 2024; 168: 112842. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2024.112842>.
36. Yao Z, Feng X, Wang Z, Zhan Y, Wu X, Xie W, Wang Z, Zhang G “Techniques and applications in 3D bioprinting with chitosan bio-inks for drug delivery: A review”. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024; 278: 134752. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134752>.
  37. Roshanbinfar K, Evans AD, Samanta S, Kolesnik-Gray M, Fiedler M, Krstic V, Engel FB, Oommen OP “Enhancing biofabrication: Shrink-resistant collagen-hyaluronan composite hydrogel for tissue engineering and 3D bioprinting applications”. *Biomaterials*. 2025; 318: 123174. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2025.123174>.
  38. Qureshi MA, Basree, Aziz R, Azim Y, Ahmad M “Polymeric hydrogels for bioprinting: A comprehensive review”. *Ann 3D Print Med*. 2025; 18: 100198. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stlm.2025.100198>.
  39. Verein Deutscher Ingenieure (VDI). VDI 2206: Design methodology for mechatronic systems. VDI-Richtlinien, VDI-Handbuch Konstruktion. 2004. Available from: <https://www.vdi.de/richtlinien/details/vdi-2206-entwicklungsmethodik-fuer-mechatronische-systeme>.
  40. Verein Deutscher Ingenieure (VDI). VDI 2206:2021-11 – Entwicklung mechatronischer und cyber-physischer Systeme. VDI-Richtlinie, Beuth Verlag. DOI: 10.31030/3366155. 2021. Available from: <https://www.vdi.de/richtlinien/details/vdi-2206-entwicklung-mechatronischer-und-cyber-physischer-systeme>.
  41. O’Connell C, Ren J, Pope L, Zhang Y, Mohandas A, Blanchard R, Duchi S, Onofrillo C. “Characterizing Bioinks for Extrusion Bioprinting: Printability and Rheology”. En: *3D Bioprinting: Principles and Protocols*. Ed. por Crook JM. New York, NY: Springer US, 2020, 111-133. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0520-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0520-2_7).
  42. Qaidi S, Yahia A, Tayeh BA, Unis H, Faraj R, Mohammed A “3D printed geopolymer composites: A review”. *Mater Today Sustain*. 2022; 20: 100240. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2022.100240>.
  43. Paxton N et al. “Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability”. *Biofabrication*. 2017; 9(4): 044107. Available from: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa8dd8>.

44. Meghan E Cooke y Daniel H Rosenzweig “The rheology of direct and suspended extrusion bioprinting”. *APL Bioengineering*. 2021; 5(1): 011502. Available from: <https://doi.org/10.1063/5.0031475>.
45. Jang S, Boddorff A, Jang DJ, Lloyd J, Wagner K, Thadhani N, Brettmann B “Effect of material extrusion process parameters on filament geometry and inter-filament voids in as-fabricated high solids loaded polymer composites”. *Addit Manuf*. 2021; 47: 102313. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addma.2021.102313>.
46. Vajda J et al. “Algorithmic linearization improves syringe-based extrusion in elastic systems using hydrogel-based materials”. *Materials & Design*. 2023; 229: 111884. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2023.111884>.
47. Dávila JL et al. “A parameterized g-code compiler for scaffolds 3D bioprinting”. *Bioprinting*. 2022; 27: e00222. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00222>.
48. Dageon Oh et al. “Rheology-informed hierarchical machine learning model for the prediction of printing resolution in extrusion-based bioprinting”. *International Journal of Bioprinting*. 2023; 9(6): 1280. Available from: <https://doi.org/10.36922/ijb.1280>.
49. Dung NGUYEN, Nghia Phan y Ha TRAN “Developing Printable and Non-Toxic Gelatin-Alginate Ink for 3D Printing using Calcium Chloride Pre-Crosslinking”. *Advanced Biomedical Engineering*. 2024; 13: 293-300. Available from: <https://doi.org/10.14326/abe.13.293>.
50. Ouyang L, Yao R, Zhao Y, Sun W “Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells”. *Biofabrication*. 2016; 8(3): 035020. Available from: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/035020>.
51. Duarte Nuno Carvalho et al. “Assessing non-synthetic crosslinkers in biomaterial inks based on polymers of marine origin to increase the shape fidelity in 3D extrusion printing”. *Biomedical Materials*. 2023; 18(5): 055017. Available from: <https://doi.org/10.1088/1748-605X/acecec>.
52. Z. Lamberger, D. W. Schubert, M. Buechner et al. “Advanced optical assessment and modeling of extrusion bioprinting”. *Scientific Reports*. 2024; 14: 13972. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-024->

64039-y.

53. Xu L, Zhang Z, Jorgensen AM, Yang Y, Jin Q, Zhang G, Cao G, Fu Y, Zhao W, Ju J, Hou R “Bioprinting a skin patch with dual-crosslinked gelatin (GelMA) and silk fibroin (SilMA): An approach to accelerating cutaneous wound healing”. *Mater Today Bio*. 2023; 18: 100550. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100550>.
54. Isabelle Matthiesen et al. “Astrocyte 3D culture and bioprinting using peptide functionalized hyaluronan hydrogels”. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2023; 24(1): 2165871. Available from: <https://doi.org/10.1080/14686996.2023.2165871>.
55. J Gausemeier y S Moehringer “VDI 2206: A New Guideline for the Design of Mechatronic Systems”. *IFAC Proceedings Volumes*. 2002; 35(2): 785-790. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1474-6670\(17\)34035-1](https://doi.org/10.1016/S1474-6670(17)34035-1).
56. ASTM International. ASTM F3659-24 Standard Guide for Bioprinting. Approved March 15, 2024. Published April 2024. Under the jurisdiction of ASTM Committee F04 on Medical and Surgical Materials and Devices. Accessed: 2025-06-10. West Conshohocken, PA, USA: ASTM International, 2024. Available from: <https://doi.org/10.1520/F3659-24>.
57. Gleadall A “FullControl GCode Designer: Open-source software for unconstrained design in additive manufacturing”. *Additive Manufacturing*. 2021; 46: 102109. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addma.2021.102109>.
58. Backes EH et al. “Protocol for designing and bioprinting multi-layered constructs to reconstruct an endothelial-epithelial 3D model”. *STAR Protocols*. 2023; 4(3): 102467. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102467>.
59. Surendrasingh Y. Sonaye et al. “Extrusion 3D (Bio)Printing of Alginate-Gelatin-Based Composite Scaffolds for Skeletal Muscle Tissue Engineering”. *Materials*. 2022; 15(22): Available from: <https://doi.org/10.3390/ma15227945>.

60. Gillispie G, Prim P, Copus J, Fisher J, Mikos AG, Yoo JJ, Atala A, Lee SJ “Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability”. *Biofabrication*. 2020; 12(2): 022003. Available from: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab6f0d>.
61. A Habib et al. “3D Printability of Alginate-Carboxymethyl Cellulose Hydrogel”. *Materials (Basel)*. 2018; 11(3): 454. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma11030454>.
62. HNDKA. Human Ear Model [3D printable file from Cults3D]. Digital repository. 2023. Available from: <https://cults3d.com/en/3d-model/art/human-ear-model>.
63. International Organization for Standardization. ISO 15190:2003 Medical laboratories – Requirements for safety. Accessed: 2025-06-10. Geneva, Switzerland, 2003. Available from: <https://www.iso.org/standard/31116.html>.
64. ASTM International. ASTM E3051-16 Standard Guide for Handling of Biomedical Waste in Health Care and Biomedical Research Facilities. Accessed: 2025-06-10. West Conshohocken, PA, USA: ASTM International, 2016. Available from: <https://www.astm.org/e3051-16.html>.
65. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) – 6th Edition. Accessed: 2025-06-10. U.S. Department of Health y Human Services, 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>.
66. World Health Organization. Safe Management of Wastes from Health-Care Activities. Accessed: 2025-06-10. 2017. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241548564>.
67. Occupational Safety and Health Administration. Laboratory Safety Guidance. Accessed: 2025-06-10. 2011. Available from: <https://www.osha.gov/Publications/laboratory/OSHA-Laboratory-Safety-Guidance.pdf>.
68. International Organization for Standardization. ISO 35001:2019 Biorisk management for laboratories and other related organisations. Accessed: 2025-06-10. Geneva, Switzerland, 2019. Available from:

<https://www.iso.org/standard/71293.html>.

69. A Ribeiro et al. “Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting”. *Biofabrication*. 2017; 10(1): 014102. Available from: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa90e2>.
70. Iberite F, Badiola-Mateos M, Loggini S, Paci C, Ruspi J, Iachetta D, Mannini A, Gruppioni E, Ricotti L “3D bioprinting of thermosensitive inks based on gelatin, hyaluronic acid, and fibrinogen: reproducibility and role of printing parameters”. *Bioprinting*. 2024; 39: e00338. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2024.e00338>.
71. International Organization for Standardization. ISO 10993-1:2018 — Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. Geneva, 2018. Available from: <https://www.iso.org/standard/68936.html>.
72. Derman ID, Moses JC, Rivera T, Ozbolat IT “Understanding the cellular dynamics, engineering perspectives and translation prospects in bioprinting epithelial tissues”. *Bioact Mater*. 2025; 43: 195-224. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2024.09.025>.
73. Duty C, Ajinjeru C, Kishore V, Compton B, Hmeidat N, Chen X, Liu P, Hassen AA, Lindahl J, Kunc V “What makes a material printable? A viscoelastic model for extrusion-based 3D printing of polymers”. *J Manuf Process*. 2018; 35: 526-537. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2018.08.008>.

## ANEXOS

### G-code personalizado para parametrización

El siguiente G-code se utilizó para parametrizar velocidad y presión en la plataforma CELLINK BIO-X. Se muestran comentarios explicativos en cada instrucción para facilitar su comprensión:

G90 ; Define coordenadas  
absolutas G21 ; Unidades a  
milímetros  
M82 ; Distancias absolutas para la extrusión

G0 X-13 Y-10 F2000 ;  
Posicionamiento inicial. G0 Z0.1  
F2000 ; altura de  
capa constante.

G1 Y10 E0.02589 F60 ; Extrusión a velocidad baja  
(60 mm/min) G0 X-8 F600 ; Posicionamiento en X  
G1 Y-10 E0.02689 F300 ; Extrusión a  
300 mm/min G0 X-3 F600 ;  
Posicionamiento en X G1 Y10  
E0.02789 F600 ; Extrusión a  
600 mm/min G0 X2 F600 ;  
Posicionamiento en X G1 Y-10  
E0.02889 F900 ; Extrusión a 900  
mm/min G0 X7 F600 ;  
Posicionamiento en X  
G1 Y10 E0.03089 F1200 ; Extrusión a 1200 mm/min

## **G-code personalizado para patrón de macroporos**

El siguiente código G fue diseñado para generar el patrón de malla empleado en la evaluación de la fidelidad geométrica de las formulaciones bioimpresas (sección 4.5.1). Este patrón permite variar sistemáticamente el espaciado entre filamentos y calcular los índices de precisión (*PR*) y desempeño estructural (*IDE*) descritos en la metodología.

; --- Configuración inicial ---

G90 ; Modo de coordenadas absolutas

G21 ; Unidades en milímetros

M82 ; extrusión absoluta

; --- Posicionamiento inicial ---

G0 X-15 Y-15 F2000 ; Mover cabezal al punto inicial

G0 Z0.1 F2000 ; Colocar boquilla a 0.1 mm de altura sobre el sustrato

; --- Primera línea vertical ---

G1 Y0 E0.02589 F600 ; Extruir hacia arriba en eje Y

; --- Desplazamiento horizontal + siguiente línea ---

G1 X-10 F600 E0.02590 ; Mover 5 mm en eje X sin

cambiar Y G1 Y-15 E0.02689 F600 ; Extruir hacia abajo en eje Y

G1 X-6 F600 E0.02690 ; Mover 4 mm en eje X

G1 Y0 E0.02789 F600 ; Extruir hacia arriba en eje Y

G1 X-3 F600 E0.02790 ; Mover 3 mm en eje X

G1 Y-15 E0.02889 F600 ; Extruir hacia abajo en eje Y

G1 X-1 F600 E0.028890 ; Mover 2 mm en eje X

G1 Y0 E0.03089 F600 ; Extruir hacia arriba en eje Y

G1 X0 F600 E0.031290 ; Mover 1 mm en eje X

G1 Y-15 E0.03289 F600 ; Extruir hacia abajo en eje Y

; --- Líneas horizontales para completar el patrón ---

G1 X-15 E0.04589 F600 ; Extruir hacia la izquierda

(cerrando malla) G1 Y-10 E0.04689 F600 ; Subir 5 mm

G1 X0 F600 E0.04690 ; Extruir hacia la derecha

G1 Y-6 E0.04789 F600 ; Subir 4 mm

G1 X-15 F600 E0.04790 ; Extruir hacia la izquierda

G1 Y-3 E0.04889 F600 ; Subir 3 mm

G1 X0 F600 E0.048890 ; Extruir hacia la derecha

G1 Y-1 E0.05089 F600 ; Subir 2 mm

G1 X-15 F600 E0.051290; Extruir hacia la izquierda

G1 Y0 E0.05289 F600 ; Subir 1 mm

G1 X0 F600 E0.054290 ; Extruir hacia la derecha (finalización del patrón)