



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Obtención y caracterización inicial de quitosano a partir de Hermetia illucens para su potencial aplicación en biotintas

Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Biomédico

que presenta:

Joaquin Enrique Martinez Flores

Asesor(es):

Denis Helan Castillo Pareja

Lima, 2026

Jurado calificador

Presidente: Mg. Juan Manuel Zuñiga Mamani

Vocal: Mg. Noe Benjamin Bazan Lavanda

Secretario: Mg. Domingo Vladimir Flores Robles

UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	MARTINEZ FLORES JOAQUIN ENRIQUE

(Agregar filas adicionales si hay más autores)

Pertenecientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOMÉDICA,** autores del trabajo titulado: **Obtención y caracterización inicial de quitosano a partir de Hermetia illucens para su potencial aplicación en biotintas,** 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:

Nº	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 **11 %**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3717777297**; fecha de entrega: **20/11/2026**).
- 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, 20 de noviembre de 2026**



Firma del asesor
N° DNI: 40219259
ORCID: 0000-0003-1010-2353

DEDICATORIA

A mis padres y a mi hermana menor, por enseñarme lo que puedo lograr y recordarme muchas veces lo que realmente soy.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, que me dio la oportunidad de poder encontrar mi pasión en el mundo de la investigación. Su confianza constante al inicio de mi formación académica en el ámbito de los biomateriales e ingeniería de tejidos me ayudó a concluir este trabajo.

A mis amigos del colegio, por haber estado conmigo durante 18 años, por convertirnos en una familia y por ayudarme sin siquiera saberlo.

Índice

Resumen **1**

Abstract **2**

I. Introducción **3**

II. Pregunta de investigación e hipótesis y objetivos **7**

2.1 Objetivos 7
2.1.1 Objetivo general 7
2.1.2 Objetivos específicos 7

2.2 Alcances y limitaciones 8

III. Estado del arte **10**

3.1 Estado del arte sobre biotintas basadas en quitosano 10

3.2 Brecha de investigación 18

IV. Marco teórico **20**

4.1 Biomateriales en la ingeniería de tejidos 20
4.1.1 Bioimpresión mediante extrusión 21
4.1.2 Biotinta 22
4.1.3 Quitosano 23
4.1.4 Alginato de sodio 25
4.1.5 Gelatina 26

4.2 Pruebas de caracterización de biotintas 28
4.2.1 Prueba de colapso de filamento extruido 28
4.2.2 Evaluación de degradabilidad del andamio 29
4.2.3 Evaluación de fidelidad de forma del andamio 31

V. Materiales y métodos **33**

5.1 Diseño experimental 33

5.2 Materiales 33

5.3 Obtención de quitosano 34
5.3.1 Preparación de la materia prima 34
5.3.2 Desmineralización 35
5.3.3 Desproteinización 35
5.3.4 Secado de la quitina 35
5.3.5 Desacetilación y purificación del quitosano 35

5.4 Caracterización del quitosano....36
5.5 Preparación de biotintas....37
5.6 Bioimpresión de andamios....37
5.7 Caracterización de los andamios bioimpresos....38
5.7.1 Prueba de colapso de filamento....38
5.7.2 Evaluación de fidelidad de forma de los andamios bioimpresos....39
5.7.3 Evaluación del índice de degradabilidad de los andamios bioimpresos....40
5.8 Análisis estadístico....40
VI. Resultados....42
6.1 Extracción de quitina y obtención de quitosano....42
6.2 Caracterización del quitosano....44
6.3 Evaluación del comportamiento estructural y estabilidad de los andamios bioimpresos....45
6.4 Evaluación de la reproducibilidad geométrica mediante el índice de imprimibilidad (Pr) 51
6.5 Evaluación del comportamiento de degradación de las biotintas reticuladas....53
VII. Discusión....56
VIII. Conclusiones....60
IX. Referencias Bibliográficas....62

Resumen

Este trabajo describe la obtención de quitosano a partir de exuvias de *Hermetia illucens* y su posterior integración en matrices de alginato de sodio y gelatina para su procesamiento mediante bioimpresión por extrusión. La caracterización del quitosano extraído mediante espectroscopía infrarroja (FTIR) registró un grado de desacetilación del 80.2 %. Se analizaron cinco formulaciones con concentraciones de quitosano al 0 %, 0.5 %, 1 %, 2 % y 3 % (p/v), evaluando su comportamiento durante la deposición y su estabilidad posterior. Los parámetros de control incluyeron el factor de colapso (C_f), el índice de fidelidad geométrica (P_r) y la tasa de degradación *in vitro* en un periodo de 14 días. Los datos obtenidos indicaron que las concentraciones al 2 % y 3 % presentaron valores de P_r próximos a la unidad y una menor pérdida de masa en comparación con la variante al 1 %. Los resultados detallan las propiedades físicas y la capacidad de retención de forma de los andamios bajo las condiciones experimentales definidas en el estudio.

Palabras clave: Hermetia illucens, quitosano, biotinta, bioimpresión 3D, andamios tisulares, ingeniería de tejidos, sostenibilidad.

Abstract

This study describes the extraction of chitosan from Hermetia illucens exuviae and its subsequent incorporation into sodium alginate and gelatin matrices for processing by extrusion-based bioprinting. Characterization of the extracted chitosan by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) revealed a degree of deacetylation of
80.2 %. Five formulations containing chitosan concentrations of 0 %, 0.5 %, 1 %, 2 %, and 3 % (w/v) were analyzed by evaluating their deposition behavior and subsequent structural stability. The evaluated parameters included the collapse factor (C_f), geometric fidelity index (P_r), and *in vitro* degradation rate over a 14-day period. The results indicated that the 2 % and 3 % chitosan formulations exhibited P_r values close to unity and lower mass loss compared with the 1 % formulation. These findings provide insight into the physical properties and shape-retention capacity of the scaffolds under the experimental conditions established in this study.

Keywords: Hermetia illucens, chitosan, bioink, 3D bioprinting, tissue scaffolds, tissue engineering, sustainability.

I. Introducción

La ingeniería de tejidos combina la ingeniería, la biología y la fisiología para obtener tejidos nuevos con una funcionalidad similar a la de los tejidos del cuerpo humano (1). Es un campo de gran interés por sus posibilidades y ventajas, y la obtención de tejidos sustitutos o estructuras elaboradas con distintos materiales y técnicas de manufactura, capaces de acelerar la regeneración tisular o de reemplazar el tejido sin alterar sus características ni su funcionalidad, se ha expandido ampliamente (2).

La manufactura aditiva es un aliado importante para lograr estos tejidos debido a la posibilidad de obtener estructuras tridimensionales de manera práctica. Esto se da gracias a la posibilidad de apilar material capa a capa para obtener un diseño único y complejo lo que amplía las posibilidades en el campo de la ingeniería de tejidos y permite manejar de una manera más controlada la arquitectura de la estructura ya que esta puede ser obtenida por diversos métodos o incluso modelar estos constructos con programas asistidos por computador (CAD). De manera más precisa, la bioimpresión se define como la aplicación de técnicas de manufactura aditiva en las que se emplean biotintas, compuestas por células, biomateriales y biomoléculas, utilizadas como materias primas de impresión para la generación de estructuras que imitan tejidos u órganos (2), (3), (4). Las aplicaciones de esta tecnología pueden abarcar distintos tejidos dentro de los cuales encontramos: piel (5), (6), cartílago (7), (8), hueso (9), (10), (11), (12) y de una manera más transversal el fomento de angiogénesis (13).

Si bien estos avances son prometedores, muchos de ellos siguen siendo temas de investigación y uno de ellos se centra en la formulación de biotintas con distintos biomateriales (4). Estas biotintas pueden ser preparadas a base de biomateriales o encontrarse comercialmente, e incluso existen algunas diseñadas para aplicaciones específicas; no obstante, tienden a tener un precio elevado y, en algunos casos, este costo puede aumentar aún más al momento de importarlas. Por ejemplo, en el caso de Cellink, biotintas a base de quitosano con un contenido total de 9 mL pueden alcanzar un precio aproximado de 389 dólares americanos (USD) (14), mientras que otras biotintas con diferentes biomateriales se encuentran en un rango de 410 a

1200 USD por hasta 30 mL (15). De manera similar, en compañías como TheWell Bioscience estos precios rondan los 405 USD (16), y en el caso de Allevi una sola jeringa de 5 mL puede costar 260 USD, mientras que un paquete completo alcanza hasta 740 USD (17) sin incluir el reactivo reticulante necesario para la formación del andamio. Además, no existen protocolos estandarizados para replicarlas, lo que obliga a adquirir nuevamente el producto. Por ello, la estrategia más común en entornos de investigación es formular biotintas propias, lo que exige un estudio detallado del comportamiento de los biomateriales empleados, ya que su elección depende directamente de las propiedades específicas que cada uno aporte (18).

Los biomateriales comerciales de grado clínico son una opción inmediata para formular biotintas, pero implican limitaciones significativas en proyectos de investigación, sobre todo con presupuestos bajos: costos que van desde unos pocos dólares hasta decenas de miles de dólares por gramo, fórmulas propietarias y patentes, y dependencia de proveedores externos, con trámites de importación y aranceles que encarecen aún más la compra (19). Estas barreras reducen la autonomía científica y comprometen la sostenibilidad de los proyectos. En contraste, el aprovechamiento de materias primas locales o de residuos biológicos se presenta como una estrategia viable dentro de un enfoque de economía circular, pues abarata costos, disminuye el consumo de recursos vírgenes y favorece la independencia tecnológica (20).

En este sentido, la tendencia actual se orienta hacia el desarrollo de procesos sostenibles y ecológicos para la obtención de biomateriales (21), lo cual ha impulsado el uso de desechos como fuente de materia prima. Dentro de estas alternativas destacan las exuvias de la mosca soldado negra (*Hermetia illucens*), consideradas una fuente prometedora para la obtención de quitina (22). El interés en esta especie ha aumentado debido a su rápida reproducción y adaptabilidad en sistemas de crianza artificial, y se ha reportado que la quitina derivada de insectos puede ser entre 20 y 50 veces superior a la obtenida de crustáceos, al carecer de sales de calcio y compuestos de flúor, lo que ofrece la posibilidad de obtener un quitosano de mayor calidad (23).

La quitina, segundo biopolímero más abundante después de la celulosa, se

encuentra en insectos, hongos y artrópodos (24). No obstante, su uso directo está limitado por su baja solubilidad en agua y su rigidez intrínseca (25); por ello, su derivado el quitosano, obtenido mediante desacetilación (reemplazo de un grupo acetamida, $-NHCOCH_3$ por un grupo amina, $-NH_2$), presenta mejores características manejables, además de propiedades antimicrobianas y antifúngicas que han facilitado su aplicación en diversos campos (26). El quitosano ha demostrado versatilidad en aplicaciones que van desde estímulos en plantas (27) y recubrimientos alimentarios (28), hasta funciones biomédicas como sistemas de liberación de fármacos (29). En ingeniería de tejidos, su capacidad de retención de agua y de minimizar la pérdida de nutrientes lo posiciona como un material valioso para biotintas (30). Numerosas formulaciones a base de quitosano han mostrado éxito en la regeneración de piel, hueso, cartílago y tejido neural (8), (30), (31), (32), (33), (34), empleando estrategias que incluyen quitosano en solución alcalina, quitosano metacrilado, y composiciones híbridas con nanocelulosa, alginato o hidroxiapatita para mejorar propiedades mecánicas y biológicas.

A pesar de los avances reportados en el desarrollo de biotintas basadas en quitosano para aplicaciones de ingeniería de tejidos, la mayoría de los estudios se han enfocado en quitosano de origen comercial o derivado de fuentes tradicionales como crustáceos. En contraste, el uso de quitosano obtenido a partir de exuvias de *Hermetia illucens* continúa siendo un área emergente y con limitada evidencia experimental en bioimpresión tridimensional. Particularmente, existe escasa información acerca de su desempeño dentro de formulaciones compuestas por alginato y gelatina destinadas a tecnologías de bioimpresión por extrusión, así como sobre el efecto de este origen del biomaterial en propiedades relevantes como la imprimibilidad, la fidelidad estructural, la estabilidad física y el comportamiento de degradación de los andamios obtenidos. Esta falta de conocimiento dificulta establecer el potencial real del quitosano derivado de insectos como alternativa sostenible y funcional frente a materiales convencionales empleados en la formulación de biotintas.

En este contexto, la presente tesis plantea evaluar la viabilidad del quitosano obtenido a partir de exuvias de *Hermetia illucens* como biomaterial base para el desarrollo de una biotinta destinada a la fabricación de andamios bioimpresos con

aplicaciones en ingeniería de tejidos. El estudio abarca la extracción y caracterización fisicoquímica de la quitina y del quitosano derivado, la formulación de una biotinta basada en este polímero y la evaluación de sus propiedades físicas y de imprimibilidad. Asimismo, incluye la caracterización de los andamios impresos en términos de fidelidad geométrica, morfología y comportamiento frente a la degradación, a fin de determinar su desempeño preliminar en parámetros asociados a la bioimpresión por extrusión, tales como la imprimibilidad, la estabilidad estructural y la degradación del material.

II. Pregunta de investigación e hipótesis y objetivos

La presente investigación busca dar respuesta a la siguiente interrogante: ¿En qué medida la concentración de quitosano derivado de *Hermetia illucens* influye en el desempeño de biotintas para bioimpresión por extrusión y en las características de los andamios obtenidos, considerando su fidelidad geométrica, estabilidad estructural y comportamiento frente a la degradación?

En concordancia con esta pregunta, se plantea la siguiente hipótesis: Un aumento en la concentración de quitosano obtenido a partir de *Hermetia illucens* conduce a una mejora en la fidelidad geométrica y la estabilidad estructural de los andamios bioimpresos por extrusión, así como a una disminución de la pérdida de masa durante su degradación.

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo general

Analizar el desempeño de formulaciones a base de quitosano obtenido de *Hermetia illucens* para su aplicación en la bioimpresión de andamios tisulares, considerando su estabilidad estructural, fidelidad de forma y degradabilidad.

2.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la estructura química del quitosano obtenido a partir de quitina de *Hermetia illucens* mediante espectroscopía FTIR, a fin de verificar la presencia de grupos funcionales característicos del polímero y determinar su grado de desacetilación.
- Formular hidrogeles conformados por quitosano, alginato y gelatina a diferentes concentraciones.

- Evaluar la estabilidad estructural de los andamios bioimpresos elaborados con biotinta de quitosano de *Hermetia illucens* mediante la determinación del factor de colapso.
- Determinar la fidelidad de forma de los andamios bioimpresos mediante el cálculo del índice de imprimibilidad.
- Analizar la degradabilidad de las distintas formulaciones de hidrogeles obtenidas a partir de biotinta de quitosano de *Hermetia illucens*, considerando la pérdida de masa y los cambios físicos observados en diferentes periodos de evaluación.

2.2 Alcances y limitaciones

La presente investigación tiene como propósito la obtención y evaluación preliminar de una formulación de biotinta elaborada a partir de quitosano derivado de *Hermetia illucens*, considerada como un material candidato para su aplicación en bioimpresión 3D mediante tecnología de extrusión. El estudio se desarrolla en condiciones controladas de laboratorio y se orienta al análisis del comportamiento del material desde un enfoque geométrico y operativo. En este contexto, se evalúan parámetros asociados a la capacidad de impresión y a la estabilidad de las estructuras generadas, tales como el factor de colapso, la fidelidad geométrica respecto al diseño digital y la pérdida de masa durante el proceso de degradación. Estos indicadores permiten describir el desempeño de la formulación en términos de su capacidad para mantener la geometría, estabilidad estructural y reproducibilidad bajo las condiciones experimentales establecidas.

El alcance del estudio se limita exclusivamente a estos parámetros, por lo que los resultados obtenidos deben interpretarse como una caracterización preliminar del comportamiento de la formulación durante la bioimpresión por extrusión. En consecuencia, no constituyen una validación integral de su uso en aplicaciones de ingeniería de tejidos, sino una aproximación inicial a su desempeño estructural.

Las limitaciones del trabajo incluyen la ausencia de células encapsuladas

en los hidrogeles, la ausencia de evaluaciones biológicas, tales como citotoxicidad, biocompatibilidad o ensayos *in vitro* e *in vivo*, lo que impide establecer conclusiones sobre la interacción del material con sistemas celulares. Asimismo, no se realizaron ensayos mecánicos ni una caracterización reológica detallada de la biotinta, por lo que no es posible inferir su comportamiento bajo esfuerzos mecánicos o su respuesta frente a condiciones de flujo. De igual forma, no se llevó a cabo una optimización sistemática de los parámetros de impresión ni estudios comparativos con biotintas comerciales o reportadas en la literatura, por lo que los resultados deben interpretarse dentro del contexto específico de la formulación y condiciones experimentales empleadas.

III. Estado del arte

El desarrollo de biomateriales para aplicaciones de biofabricación ha impulsado la investigación de polímeros naturales como el quitosano, debido a sus propiedades fisicoquímicas y su potencial incorporación en formulaciones destinadas a la bioimpresión por extrusión. En este contexto, diversos estudios han explorado tanto la obtención de quitosano a partir de fuentes alternativas, entre ellas *Hermetia illucens*, como su combinación con otros biomateriales y su comportamiento durante la fabricación de estructuras tridimensionales. La revisión de estos antecedentes permite identificar los principales avances y enfoques empleados en este campo, así como las limitaciones y aspectos aún poco estudiados relacionados con la imprimibilidad, estabilidad estructural y degradabilidad de formulaciones basadas en este biopolímero.

3.1 Estado del arte sobre biotintas basadas en quitosano

El desarrollo de biotintas para bioimpresión tridimensional ha evolucionado hacia el empleo de sistemas multicomponente capaces de integrar propiedades de imprimibilidad, estabilidad estructural, degradabilidad y, en aplicaciones específicas, respuesta biológica. Las revisiones analizadas coinciden en señalar que los biomateriales naturales presentan ventajas relacionadas con su biocompatibilidad y similitud con componentes de la matriz extracelular; sin embargo, su utilización individual suele presentar limitaciones para satisfacer simultáneamente los requerimientos reológicos, mecánicos y de estabilidad necesarios durante la bioimpresión (35), (36), (37), (38), (39). En este contexto, el quitosano, el alginato y la gelatina aparecen recurrentemente como componentes de interés, ya sea solos o combinados con otros polímeros y agentes de entrecruzamiento (35), (37), (36), (38).

El quitosano se ha estudiado en diferentes configuraciones químicas y formulaciones, aunque los trabajos experimentales revisados emplean principalmente material comercial o derivado de fuentes convencionales, en

particular crustáceos (40), (41), (42). Una parte de las investigaciones recientes ha modificado químicamente el polímero para mejorar su solubilidad, su funcionalidad o su comportamiento durante el procesamiento. Entre estos sistemas se encuentran el quitosano cuaternizado y los derivados carboximetilados, utilizados en combinación con alginato, gelatina o fibrina (43), (42). Estas modificaciones permiten ajustar las propiedades del material, pero dificultan la extrapolación directa de los resultados obtenidos con derivados de quitosano hacia el quitosano convencional, debido a que los cambios en la estructura química pueden alterar significativamente la interacción con los demás componentes, la reología y el comportamiento de entrecruzamiento (43), (42), (39).

Una tendencia particularmente consistente corresponde al empleo de formulaciones híbridas de quitosano y alginato. La combinación de ambos polímeros permite aprovechar las características complementarias de cada componente y modificar la respuesta de la formulación durante la extrusión (40), (41), (42). En sistemas experimentales basados en quitosano y alginato se ha observado que la incorporación o incremento del alginato puede favorecer la recuperación estructural después del cizallamiento y mejorar la fidelidad de las estructuras impresas (40), (44). Este comportamiento puede relacionarse con las interacciones entre ambos polisacáridos y con la formación de redes que contribuyen a la estabilidad del material (40), (41). La incorporación de otros componentes, como gelatina, fibrina o partículas cerámicas, constituye una estrategia adicional para modificar las propiedades reológicas, mecánicas o biológicas de las biotintas (43), (42), (40).

La concentración de quitosano constituye otra de las variables que presenta mayor interés en los estudios experimentales. Sin embargo, los resultados revisados no permiten establecer una concentración universalmente óptima, debido a que el efecto de esta variable depende de la composición global y de las características del quitosano empleado (41), (43), (42). En sistemas basados en alginato y quitosano se ha observado que concentraciones relativamente bajas pueden resultar insuficientes para proporcionar la viscosidad necesaria para mantener la geometría de la estructura, mientras que incrementos excesivos pueden dificultar la extrusión y reducir la fidelidad de impresión (41), (42). Por ejemplo, Khoshnood et al. reportaron que una concentración de 2 % de quitosano presentó una viscosidad

insuficiente, mientras que una formulación con 3 % permitió obtener estructuras más uniformes; no obstante, concentraciones superiores incrementaron excesivamente la viscosidad y afectaron negativamente la impresión (41). De manera similar, en sistemas basados en carboximetil quitosano, el incremento de la concentración del derivado y del alginato produjo formulaciones con mayor viscosidad, pero con menor uniformidad de las estructuras impresas (42). Estos resultados indican que el efecto de la concentración depende no solamente de la cantidad de quitosano, sino también de su naturaleza química, características fisicoquímicas, concentración de los demás componentes y condiciones de procesamiento (43), (41), (42).

El comportamiento reológico constituye, por ello, uno de los principales criterios utilizados para analizar la aptitud de una formulación para bioimpresión por extrusión (36), (37), (39). Los estudios experimentales que caracterizan reológicamente las biotintas basadas en quitosano reportan de manera recurrente un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento, o *shear-thinning*, caracterizado por una disminución de la viscosidad conforme aumenta la velocidad de corte (40), (41), (43), (42). Esta característica resulta favorable para la extrusión, debido a que permite reducir la resistencia al flujo durante el paso de la biotinta por la boquilla y facilita posteriormente la recuperación de la estructura depositada (40), (41). Asimismo, algunos estudios han evaluado el comportamiento viscoelástico y la recuperación posterior al cizallamiento, encontrando que la incorporación de alginato puede favorecer la recuperación estructural y contribuir a la estabilidad de los filamentos depositados (40).

La evaluación de la imprimibilidad se ha realizado mediante diferentes aproximaciones. Entre ellas destaca el índice de imprimibilidad (*Pr*), empleado para cuantificar la fidelidad geométrica de estructuras impresas (40), (42). Los estudios que utilizaron este indicador obtuvieron valores próximos a la unidad en formulaciones consideradas adecuadas para bioimpresión. Mainardi et al. reportaron valores de *Pr* de $1{,}07 \pm 0{,}10$ después de tres capas y $0{,}96 \pm 0{,}04$ después de ocho capas, mientras que Juraski et al. obtuvieron valores comprendidos entre 0.93 y 0.98 para las formulaciones evaluadas (40), (42). Estos resultados respaldan el empleo de valores próximos a uno como referencia para evaluar una elevada

fidelidad geométrica. No obstante, los estudios también muestran que un valor favorable de *Pr* no necesariamente representa de manera completa el comportamiento estructural de una biotinta. Juraski et al., por ejemplo, observaron diferencias en la uniformidad de las capas entre formulaciones que presentaban valores de *Pr* dentro de un intervalo similar (42). Por ello, la evaluación de la imprimibilidad mediante un único indicador puede resultar insuficiente para caracterizar integralmente el desempeño estructural de una biotinta.

Además de la imprimibilidad, la estabilidad posterior a la impresión constituye una propiedad fundamental para el desempeño de los andamios bioimpresos (36), (37), (38). Los estudios revisados han empleado diferentes aproximaciones para evaluarla, incluyendo hinchamiento, pérdida de masa, disolución, análisis morfológico y caracterización de las propiedades mecánicas (40), (43), (41), (42). En sistemas de quitosano y alginato se ha observado que la incorporación de quitosano puede contribuir a incrementar la estabilidad de los hidrogeles y reducir su pérdida de masa durante la degradación (41). Sin embargo, las condiciones de entrecruzamiento desempeñan también un papel determinante, por lo que los resultados obtenidos mediante diferentes agentes y tiempos de entrecruzamiento no son directamente comparables (40), (43), (41). Esta heterogeneidad metodológica constituye una dificultad para establecer relaciones generales entre composición y estabilidad.

En cuanto a las técnicas de caracterización, la literatura muestra una tendencia hacia la utilización de múltiples ensayos complementarios. El análisis reológico permite caracterizar el comportamiento del material durante el flujo y evaluar propiedades relacionadas con la extrusión; la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) permite analizar grupos funcionales y posibles interacciones químicas entre los componentes; la microscopía electrónica de barrido (SEM) permite estudiar la morfología de las estructuras; mientras que los ensayos de imprimibilidad permiten evaluar la fidelidad geométrica (40), (43), (41), (42). Por otra parte, los estudios orientados hacia aplicaciones biológicas suelen incorporar ensayos de viabilidad celular, diferenciación y actividad biológica (44), (43), (41), (42). Esta diversidad refleja que la evaluación de una biotinta requiere considerar diferentes niveles de desempeño y que ningún ensayo individual permite

establecer por sí mismo su aptitud para bioimpresión.

En conjunto, los estudios revisados muestran que el desempeño de las biotintas basadas en quitosano resulta de la interacción entre la concentración y naturaleza del quitosano, la composición de la matriz polimérica, las interacciones entre los componentes, el sistema de entrecruzamiento y los parámetros de impresión (40), (43), (41), (42). Aunque existe evidencia consistente sobre el potencial del quitosano combinado con alginato y otros biomateriales para mejorar la estabilidad y procesabilidad de las formulaciones, persisten diferencias importantes entre los sistemas estudiados (35), (36), (37), (38),
(39). Estas diferencias se relacionan con la fuente del quitosano, sus modificaciones químicas, las concentraciones empleadas, los agentes de entrecruzamiento y los métodos utilizados para evaluar la imprimibilidad y estabilidad (43), (41), (42). En consecuencia, los resultados obtenidos para un sistema particular no pueden extrapolarse directamente a otras formulaciones sin considerar las características específicas de cada biotinta.

Tabla 3.1: Síntesis del estado del arte sobre biotintas basadas en quitosano y su aplicación en bioimpresión.

Autor	Fuente	Formulación	Técnica	Parámetros	Evaluación	Resultados	Limitaciones	Ref.
Layrolle et al.	Diversas fuentes	Quitosano + alginato, gelatina, colágeno, fibrina y otros	Diversas	No aplica	Fisicoquímica, imprimibilidad y propiedades biológicas	Las mezclas de biomateriales permiten equilibrar imprimibilidad, propiedades mecánicas y respuesta celular	Revisión; no define concentración óptima	(35)
Liu et al.	Diversas fuentes	Quitosano, alginato, gelatina y otras biomacromoléculas	Extrusión, inkjet, láser	Variables según estudio	Reología, printability, fidelidad, degradación y mecánica	El desempeño depende de composición, concentración, gelificación y parámetros de impresión	Heterogeneidad; sin valores universales	(37)
Bramhe et al.	Diversas fuentes	Sistemas naturales y sintéticos	Extrusión, inkjet y otras	Variables según estudio	Reología, printability, mecánica, degradación y biocompatibilidad	Las combinaciones permiten complementar propiedades de los biomateriales	Revisión; sin formulación experimental comparable	(36)
Chiticaru et al.	Diversas fuentes	Quitosano, alginato, gelatina, colágeno, HA y combinaciones	Extrusión, inkjet, láser	Variables según estudio	Printability, mecánica, degradación y viabilidad	Quitosano + alginato permiten ajustar propiedades estructurales y de procesamiento	Revisión heterogénea	(38)

Continúa en la siguiente página

Tabla 3.1 – Síntesis del estado del arte sobre biotintas basadas en quitosano y su aplicación en bioimpresión.

Autor	Fuente	Formulación	Técnica	Parámetros	Evaluación	Resultados	Limitaciones	Ref.
Upadhyay et al.	Quitosano convencional	Alginato 1–2 % + quitosano 2 % + $CaCl_2$/glutaraldehído	Microfluídica	Según formulación	Viabilidad, proliferación y diferenciación condrogénica	Mayor alginato produjo hidrogeles más densos, estables y homogéneos	No es extrusión; no evalúa Pr ni factor de colapso	(44)
Mainardi et al.	Comercial; DD = 85 ± 5 %	Quitosano 0,95–1,35 % + alginato + alúmina + genipina	Extrusión neumática	20 ± 5 kPa; 10 mm/s; 940 μm; 30 °C	Reología, Pr, estabilidad y viabilidad	Pr = 1,07 ± 0,10 y 0,96 ± 0,04; el alginato mejoró la fidelidad	Alta alúmina; no evalúa factor de colapso ni degradación gravimétrica	(40)
Lu et al.	Quitosano modificado	Gelatina + alginato + QCS 0–1,5 %	Extrusión	Según formulación	FTIR, NMR, reología, impresión, mecánica, degradación y viabilidad	1,5 % QCS mostró el mejor desempeño global	Quitosano modificado; enfoque en heridas	(43)
Khoshnood et al.	Comercial	Alginato + quitosano 2–3 %	Extrusión	Según formulación	FTIR, SEM, reología, degradación y viabilidad	3 % produjo estructuras uniformes; >3 % aumentó excesivamente la viscosidad	No emplea gelatina; no evalúa Collapse Factor	(41)
Prakash et al.	Diversas fuentes	Quitosano, alginato, celulosa y derivados	Extrusión, inkjet, láser, SLA	No aplica	Printability, mecánica, degradación y actividad antimicrobiana	Las modificaciones químicas mejoran propiedades funcionales, pero deben mantener buena imprimibilidad	Revisión; sin formulación comparable	(39)

Continúa en la siguiente página

Tabla 3.1 – Síntesis del estado del arte sobre biotintas basadas en quitosano y su aplicación en bioimpresión.

Autor	Fuente	Formulación	Técnica	Parámetros	Evaluación	Resultados	Limitaciones	Ref.
Juraski et al.	Camarón; carboximetilado	CMCS + alginato 1–3 % + fibrina	Extrusión	3–20 kPa; 10 mm/s; 1 mm; 40 % infill	Pr, reología, FTIR, hinchamiento y viabilidad	Pr = 0,93–0,98; 1 % mostró mejor uniformidad	CMCS + fibrina; no evalúa degradación gravimétrica	(42)

3.2 Brecha de investigación

La literatura revisada evidencia que el quitosano constituye un biomaterial de interés para el desarrollo de biotintas destinadas a bioimpresión tridimensional, particularmente cuando se combina con otros polímeros naturales como el alginato y la gelatina (35), (36), (37), (38). Asimismo, diferentes estudios han demostrado que la concentración de quitosano puede modificar significativamente la viscosidad, el comportamiento de flujo, la fidelidad de impresión y la estabilidad de las estructuras obtenidas (40), (41),
(42). Por otra parte, la literatura ha incorporado diferentes estrategias de modificación química del quitosano para mejorar propiedades específicas, como ocurre con el quitosano cuaternizado y los derivados carboximetilados (43), (42), (39).

Sin embargo, dentro de los estudios experimentales revisados, el quitosano empleado procede principalmente de fuentes comerciales o convencionales, particularmente de crustáceos, mientras que no se identificó un estudio experimental equivalente centrado en una biotinta elaborada con quitosano obtenido a partir de *Hermetia illucens* y formulada con alginato y gelatina (40), (43), (41), (42). Esta diferencia resulta relevante debido a que la fuente de obtención del quitosano puede estar asociada con características fisicoquímicas del polímero que influyen sobre su comportamiento durante la preparación y procesamiento de la biotinta. Por ello, los resultados obtenidos con quitosanos de otras procedencias no necesariamente pueden extrapolarse directamente al material obtenido de *H. illucens*.

Asimismo, aunque diversos estudios han evaluado la imprimibilidad mediante parámetros reológicos, índice de imprimibilidad, análisis morfológico y otros indicadores, existe heterogeneidad en las metodologías empleadas para caracterizar la estabilidad de las estructuras después de la impresión (40), (43), (41), (42). En particular, los estudios revisados no integran de manera sistemática la evaluación de la fidelidad geométrica mediante índice de imprimibilidad, la estabilidad estructural mediante pruebas de colapso y un indicador de desempeño estructural, junto con la evaluación de la degradación en

una formulación basada en quitosano, alginato y gelatina.

En este contexto, la presente investigación busca contribuir a este vacío mediante la evaluación de la influencia de la concentración de quitosano obtenido a partir de *Hermetia illucens* sobre la imprimibilidad, estabilidad estructural y degradabilidad de andamios bioimpresos mediante extrusión. De esta manera, el estudio no pretende establecer la superioridad del quitosano de *H. illucens* frente a otras fuentes ni demostrar su desempeño biológico, sino generar evidencia experimental sobre su comportamiento como componente de una biotinta mediante una caracterización preliminar centrada en variables estructurales y fisicoquímicas.

IV. Marco teórico

Este capítulo presenta los fundamentos conceptuales y técnicos que sustentan el desarrollo metodológico de la tesis. Se revisan los biopolímeros más empleados en bioimpresión por extrusión, los criterios funcionales que determinan su comportamiento estructural y los enfoques habituales de evaluación operativa.

4.1 Biomateriales en la ingeniería de tejidos

El uso de biomateriales se remonta a prácticas empíricas antiguas, en las que distintas civilizaciones empleaban materiales naturales para reemplazar o reparar partes del cuerpo. Ejemplos de ello son las trepanaciones craneanas y las primeras sustituciones dentales en la Italia etrusca, que muestran una comprensión temprana de la interacción entre materiales y sistemas biológicos (45), (46). Sin embargo, el concepto formal de biomaterial y su estudio científico sistemático surgieron recién en el siglo XX, y desde entonces se consolidaron como un campo interdisciplinario.

Actualmente, un biomaterial se define como cualquier sustancia o combinación de sustancias, de origen natural o sintético, capaz de interactuar con sistemas biológicos para reemplazar, restaurar o mejorar la función de un tejido u órgano (47). Esta definición incluye polímeros naturales como el colágeno, el alginato y el quitosano, que han mostrado un alto potencial en regeneración tisular.

En ingeniería de tejidos, los biomateriales son componentes esenciales de los andamios tridimensionales, que dan soporte estructural a la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Según el paradigma de Langer y Vacanti, la ingeniería de tejidos se basa en la interacción entre células, andamios y factores bioactivos, y los biomateriales determinan el diseño y el desempeño de estos sistemas (48).

Para su aplicación, los biomateriales deben cumplir requisitos como biocompatibilidad, biodegradabilidad controlada y propiedades mecánicas adecuadas; en tecnologías como la bioimpresión 3D se suman las propiedades

reológicas que permitan su procesamiento. La viscosidad, el comportamiento frente a esfuerzos de corte y la estabilidad estructural posterior a la deposición son factores críticos en la formulación de biotintas.

La bioimpresión tridimensional por extrusión ha impulsado el desarrollo de biomateriales que puedan depositarse capa por capa manteniendo su integridad estructural y su fidelidad geométrica. Esto ha ampliado la fabricación de andamios con geometrías complejas para aplicaciones como la regeneración ósea, cartilaginosa y dérmica, entre otras (49).

La selección de biomateriales depende, por tanto, no solo de su compatibilidad biológica, sino también de su comportamiento durante la impresión. El quitosano, el alginato y la gelatina se han estudiado ampliamente porque permiten formar biotintas de propiedades ajustables, lo que los convierte en candidatos relevantes para la bioimpresión de tejidos.

4.1.1 Bioimpresión mediante extrusión

La bioimpresión por extrusión es una de las técnicas más empleadas en ingeniería de tejidos, basada en la deposición capa por capa de biotintas a través de una boquilla, siguiendo los principios de la manufactura aditiva (50). Este proceso permite la colocación controlada de biomateriales y células, posibilitando la fabricación de estructuras tridimensionales con geometrías predefinidas y organización espacial definida (51).

Durante la bioimpresión, la biotinta es forzada a fluir a través de la boquilla mediante la aplicación de presión neumática o mecánica, generando un filamento continuo que es depositado sobre una superficie. La calidad de este proceso depende en gran medida de la capacidad del material para fluir de manera controlada durante la extrusión y mantener su forma tras la deposición. Para ello son determinantes la viscosidad, la capacidad de deformación bajo esfuerzo y la recuperación estructural posterior, que influyen en la estabilidad del filamento impreso.

Esta técnica presenta limitaciones asociadas al comportamiento de las biotintas. Una de ellas es el colapso del filamento, que ocurre cuando el material no es lo

bastante estable para soportar su propio peso tras la deposición y afecta la integridad estructural del andamio. Otra es la difusión lateral del material, que puede reducir la fidelidad geométrica al alterar las dimensiones de los poros y la precisión de la estructura impresa. Ambos fenómenos están directamente relacionados con las propiedades físicas del material y con las condiciones del proceso de impresión (52).

Por ello, evaluar la imprimibilidad de una biotinta es fundamental: permite determinar si puede extruirse de forma continua y formar estructuras estables con alta fidelidad geométrica. El factor de colapso y el índice de imprimibilidad se han utilizado ampliamente para caracterizar el desempeño de biotintas en bioimpresión por extrusión, al relacionar las propiedades del material con la calidad de las estructuras obtenidas (53).

Entre las principales ventajas de esta técnica se encuentran su relativa simplicidad, bajo costo y versatilidad en el uso de materiales, incluyendo polímeros naturales y sintéticos, así como su capacidad para fabricar estructuras multicapa con geometrías complejas. Además, la integración con herramientas de diseño asistido por computadora y técnicas de imagen médica permite el desarrollo de constructos personalizados con aplicaciones en medicina regenerativa (54).

4.1.2 Biotinta

Una biotinta se define como una formulación compuesta por biomateriales, con o sin células, diseñada para ser procesada mediante técnicas de bioimpresión con el fin de fabricar estructuras tridimensionales funcionales. Estas formulaciones permiten recrear microambientes biomiméticos que favorecen la interacción célula-célula y célula-biomaterial, siendo fundamentales en aplicaciones de ingeniería de tejidos (55).

En particular, los hidrogeles basados en polímeros naturales han sido ampliamente utilizados como biotintas debido a su alta biocompatibilidad, capacidad de retención de agua y similitud con la matriz extracelular. Estas características facilitan la difusión de nutrientes, oxígeno y moléculas bioactivas,

y promueven la viabilidad y proliferación celular dentro de las estructuras impresas (56), (57).

En bioimpresión por extrusión, el desempeño de una biotinta está estrechamente relacionado con su comportamiento durante la deposición. Debe fluir a través de la boquilla bajo presión y, a la vez, mantener la continuidad del filamento y su estabilidad tras la deposición. Este equilibrio depende de la viscosidad, la capacidad de deformación bajo esfuerzo y la recuperación estructural del material (58).

La viscosidad es determinante porque influye tanto en la facilidad de extrusión como en la estabilidad del constructo. Una viscosidad elevada puede favorecer la integridad estructural y reducir la deformación del filamento; una viscosidad baja facilita la extrusión y puede mejorar la viabilidad celular, pero compromete la fidelidad geométrica de la estructura impresa. El comportamiento del material debe ajustarse, por tanto, a un rango que optimice a la vez la extrusión y la estabilidad posterior a la impresión.

La imprimibilidad integra la capacidad del material para extruirse de forma continua, formar filamentos estables y mantener la geometría diseñada, aspectos que pueden cuantificarse mediante el índice de imprimibilidad y el factor de colapso (59).

Por lo tanto, una biotinta ideal debe presentar no solo biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja inmunogenicidad, sino también propiedades físicas que permitan su adecuada procesabilidad y estabilidad estructural, asegurando la formación de andamios con alta fidelidad geométrica y desempeño funcional en aplicaciones de ingeniería de tejidos (60).

4.1.3 Quitosano

La quitina es un polisacárido natural compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina, considerado el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Se encuentra principalmente en exoesqueletos de crustáceos, paredes celulares de hongos e insectos, siendo estos últimos una fuente alternativa sostenible para su obtención (61).

El quitosano es un polímero derivado de la quitina, obtenido mediante un proceso de desacetilación, en el cual los grupos acetilo son removidos para generar unidades repetitivas de β -(1,4)-D-glucosamina. El grado de desacetilación, definido como la proporción de estas unidades, es un parámetro clave que influye directamente en la solubilidad, carga superficial y comportamiento fisicoquímico del material. Generalmente, se considera quitosano cuando este grado supera el 40 %, pudiendo alcanzar valores cercanos al 75 % (61), (62).

Desde el punto de vista de la bioimpresión, el quitosano presenta características relevantes debido a su naturaleza catiónica, biocompatibilidad y capacidad de formar soluciones viscosas en medios ácidos. Estas propiedades permiten su uso en la formulación de biotintas, donde puede contribuir a la cohesión del material y a la formación de estructuras tridimensionales. Sin embargo, su capacidad de gelificación es limitada en comparación con otros polímeros, lo que puede afectar la estabilidad estructural posterior a la deposición (63).

Asimismo, el comportamiento del quitosano durante la extrusión está influenciado por su peso molecular y grado de desacetilación, los cuales determinan su viscosidad y capacidad de mantener la forma tras la impresión. En este contexto, una viscosidad adecuada puede favorecer la continuidad del filamento y reducir el colapso de las estructuras, mientras que valores inadecuados pueden comprometer la fidelidad geométrica del constructo.

Debido a estas características, el quitosano es comúnmente combinado con otros biomateriales, como alginato o gelatina, con el fin de mejorar sus propiedades de imprimibilidad y estabilidad post-impresión. Estas combinaciones permiten ajustar el comportamiento del material, facilitando su uso en aplicaciones de ingeniería de tejidos mediante bioimpresión por extrusión (64), (65).

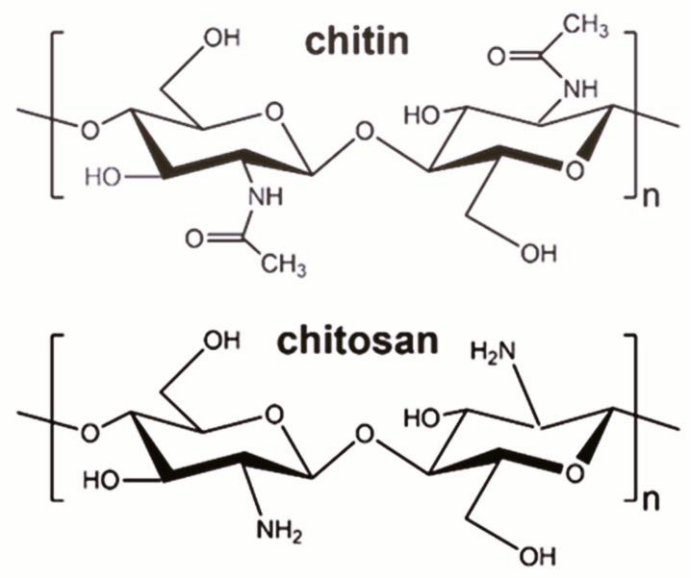


Figura 4.1: Estructura química de la quitina y su derivado, el quitosano, obtenida mediante desacetilación. La conversión implica la sustitución de grupos acetilo por grupos amino, lo que modifica las propiedades fisicoquímicas del material.

4.1.4 Alginato de sodio

El alginato es un polímero aniónico natural extraído de algas marrones, ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad y capacidad de formar hidrogeles. Está compuesto por unidades de β-(1,4)-D-manuronato
(M) y α-L-guluronato (G), cuya proporción y distribución influyen directamente en sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas (49), (66).

Una de las características más relevantes del alginato es su capacidad de gelificación en presencia de iones divalentes, como el calcio (Ca^{2+}), mediante la formación de enlaces iónicos entre los bloques de guluronato. Así se generan redes tridimensionales estables, lo que lo convierte en un material clave para la formación de andamios en ingeniería de tejidos.

En bioimpresión por extrusión, el alginato es fundamental para la estabilidad estructural de las biotintas. Su gelificación rápida favorece la retención de la forma tras la deposición, reduce el colapso del filamento y mejora la fidelidad geométrica de las estructuras impresas. Por esta razón es uno de los

biomateriales más utilizados como componente base de biotintas.

Presenta, no obstante, algunas limitaciones. La ausencia de sitios de adhesión celular y su degradación relativamente limitada pueden afectar la interacción celular y la remodelación del tejido. Además, su comportamiento mecánico depende en gran medida de la concentración y del proceso de reticulación, lo que puede producir estructuras de rigidez variable (67).

Debido a estas limitaciones, el alginato suele combinarse con otros biomateriales, como quitosano o gelatina, con el objetivo de mejorar la bioactividad, modular la viscosidad y optimizar la imprimibilidad. Estas combinaciones permiten ajustar tanto el comportamiento durante la extrusión como la estabilidad post-impresión, facilitando la obtención de estructuras con propiedades adecuadas para aplicaciones en ingeniería de tejidos (68), (69), (70).

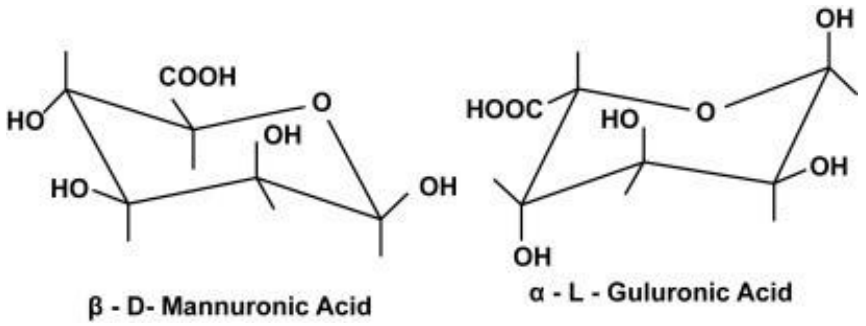


Figura 4.2: Estructura química de los monómeros del alginato: ácido β-D-manurónico (M) y ácido α-L-gulurónico (G), cuya proporción y distribución determinan las propiedades fisicoquímicas del polímero.

4.1.5 Gelatina

La gelatina es un biopolímero derivado del colágeno, obtenido mediante procesos de hidrólisis ácida o alcalina. Está compuesta principalmente por proteínas y presenta una alta disponibilidad y menor costo en comparación con su precursor, manteniendo propiedades similares en términos de biocompatibilidad y funcionalidad biológica (71).

Este biomaterial ha sido ampliamente utilizado en aplicaciones de ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y capacidad de favorecer la adhesión, proliferación y diferenciación celular (72).

Desde el punto de vista de la bioimpresión, una de las características más relevantes de la gelatina es su comportamiento termo-reversible. A temperaturas elevadas, la gelatina se encuentra en estado sol, presentando una viscosidad relativamente baja que facilita su extrusión. Sin embargo, al disminuir la temperatura, experimenta una transición a estado gel, lo que contribuye a la estabilización de la estructura depositada.

En el contexto de la bioimpresión por extrusión, este comportamiento permite mejorar la continuidad del filamento durante la deposición y favorecer la retención de la forma tras la impresión. Asimismo, su viscosidad puede ser modulada mediante la concentración, temperatura y pH, lo que permite ajustar el comportamiento del material durante el proceso de impresión (73).

No obstante, la gelatina por sí sola presenta una estabilidad mecánica limitada, lo que restringe su uso como material estructural principal. Por esta razón, suele emplearse en combinación con otros biomateriales, como alginato y quitosano, actuando como un modificador reológico que mejora la imprimibilidad y contribuye a la formación de estructuras más estables en aplicaciones de bioimpresión tridimensional (74).

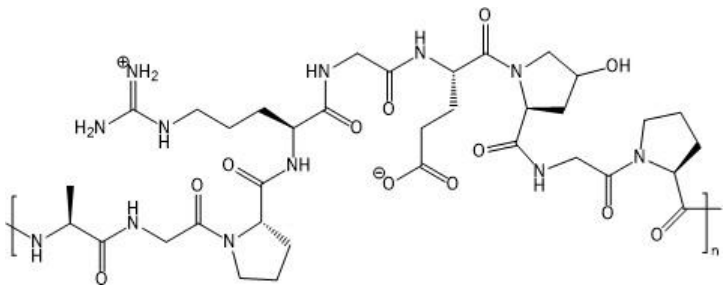


Figura 4.3: Estructura química representativa de la gelatina, un biopolímero derivado del colágeno compuesto por cadenas polipeptídicas. Su composición y organización molecular le confieren propiedades termo-reversibles relevantes para su uso en biotintas.

4.2 Pruebas de caracterización de biotintas

4.2.1 Prueba de colapso de filamento extruido

La prueba de colapso de filamento (filament collapse test) constituye un método cuantitativo ampliamente empleado para evaluar la fidelidad de forma de las biotintas utilizadas en procesos de bioimpresión por extrusión. Este ensayo se basa en la deposición de un filamento único entre dos soportes o sobre una plataforma provista de pilares distribuidos a diferentes distancias, con el propósito de analizar la deformación o el colapso del filamento inducido por la gravedad y las fuerzas de tensión superficial. De acuerdo con Schwab et al., tras la deposición del filamento se calcula el Collapse Area Factor (C_f), el cual expresa el porcentaje del área real colapsada con respecto al área teórica ideal. Un valor de C_f cercano al 100 % indica que el filamento conserva su geometría inicial, característica de biotintas con alta viscosidad o elevada tensión de fluencia, mientras que valores próximos al 0 % evidencian un colapso completo, propio de biotintas con comportamiento más fluido (75). El factor de colapso se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\text{Factor de colapso } (C_f) = \frac{A_r}{A_t} \times 100 \tag{4.1}$$

Donde A_r es el área real proyectada del filamento colapsado y A_t es el área teórica ideal del filamento perfectamente recto. El procedimiento experimental consiste en imprimir filamentos que puentean pilares espaciados entre 1 y 16 mm, capturar imágenes inmediatamente después de la impresión y determinar, a partir de dichas imágenes, la deflexión vertical o el área colapsada. Habib et al. definieron el Cf como la relación entre el área real y el área teórica multiplicada por 100, de modo que 0 % corresponde a un filamento fracturado y 100 % a uno completamente estable (76). De manera complementaria, Russo et al. reportaron que, para distancias inferiores a 4 mm, los filamentos mantienen su estabilidad estructural; sin embargo, a 8 mm presentan ángulos de deflexión entre 7° y 10°, y a 16 mm entre 18° y 27°. Se observa un incremento proporcional con la distancia y con la concentración de gelatina en la formulación de la biotinta (77).

Esta metodología permite evaluar la fidelidad estructural de las biotintas, entendida como su capacidad para mantener poros o estructuras suspendidas sin deformaciones significativas posteriores al proceso de impresión. Ribeiro et al. demostraron, a través de un modelo teórico, la existencia de una correlación directa entre la tensión de fluencia y el grado de colapso del filamento, concluyendo que un incremento de la tensión de fluencia mejora sustancialmente la imprimibilidad y la estabilidad estructural de las biotintas (78), (79).

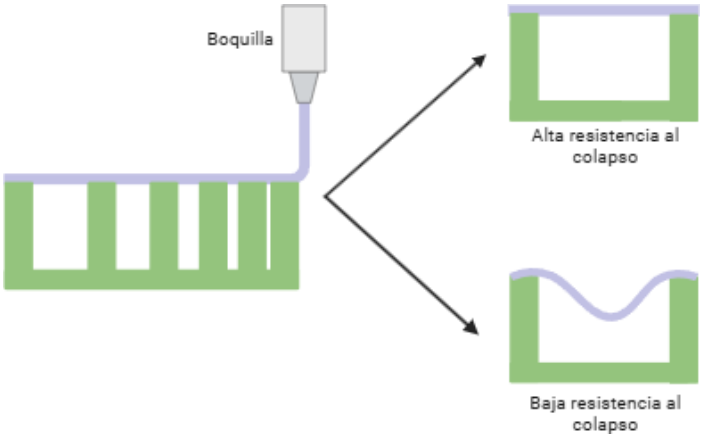


Figura 4.4: Esquema ilustrativo del procedimiento experimental correspondiente al ensayo de colapso de filamento, utilizado para analizar la estabilidad estructural de biotintas durante el proceso de bioimpresión 3D por extrusión.

4.2.2 Evaluación de degradabilidad del andamio

La prueba de degradabilidad es un ensayo *in vitro* empleado para evaluar la estabilidad y la pérdida de masa de andamios o hidrogeles bajo condiciones fisiológicas simuladas. El principio del ensayo consiste en sumergir las muestras secas en una solución tampón, usualmente PBS (pH = 7.4), a una temperatura de 37 °C, y cuantificar la variación de masa a lo largo del tiempo. Este procedimiento permite determinar la tasa de degradación del material y su compatibilidad temporal con la regeneración del tejido de destino, un aspecto fundamental en ingeniería de tejidos (ASTM F1635–11; ASTM F2900–11). Una degradación acelerada puede comprometer la función estructural del andamio,

mientras que una degradación demasiado lenta puede interferir con la integración del tejido regenerado (80).

El método empleado es de tipo gravimétrico. Inicialmente, se determina el peso seco del andamio (W_0), el cual se sumerge en el medio tampón durante periodos definidos, reemplazando la solución periódicamente para mantener las condiciones fisiológicas. En intervalos establecidos (por ejemplo, 1, 7, 14 y 21 días), las muestras son extraídas, secadas hasta peso constante y pesadas nuevamente (W_d). El porcentaje de degradación se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\text{Degradación (\%)} = \frac{W_0 - W_d}{W_0} \times 100 \tag{4.2}$$

Este procedimiento ha sido ampliamente reportado en la literatura científica. Por ejemplo, se ha observado que hidrogeles compuestos por gelatina, alginato y quitosano presentan una pérdida de masa acumulativa superior al 70–80 % luego de tres semanas de inmersión en PBS a 37 °C (Amiryaghoubi et al., 2021). La cinética de degradación depende directamente de la composición y del grado de entrecruzamiento del material. El alginato, por ejemplo, se disuelve rápidamente por intercambio iónico ($Ca^{2+} \rightarrow Na^{+}$), mientras que la gelatina se degrada principalmente por mecanismos hidrolíticos y el quitosano por procesos enzimáticos o iónicos más lentos (81).

El análisis de los resultados se realiza mediante la construcción de curvas de pérdida de masa frente al tiempo, lo cual permite determinar la velocidad y el patrón de degradación del material. En estudios con andamios de gelatina–quitosano se ha registrado una pérdida de masa del 30–55 % durante los primeros tres días y aproximadamente del 80 % al día 21 de incubación, reflejando una degradación controlada y progresiva (82), (80).

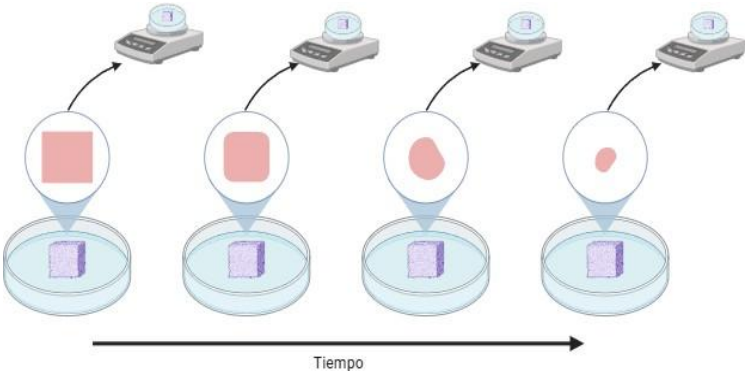


Figura 4.5: Diagrama representativo del ensayo de degradación realizado sobre andamios bioimpresos para analizar su estabilidad estructural en medio acuoso mediante gravimetría.

4.2.3 Evaluación de fidelidad de forma del andamio

La prueba de fidelidad de forma, también denominada *form fidelity test* o *printability index test*, es un método cuantitativo utilizado en bioimpresión tridimensional por extrusión para evaluar la capacidad de una biotinta de mantener la geometría prevista tras el proceso de impresión. Este ensayo se basa en el análisis de estructuras reticulares impresas, generalmente en forma de mallas de filamentos dispuestos ortogonalmente, con el fin de determinar la conservación del tamaño y la forma de los poros diseñados en el modelo digital (83), (84).

La métrica más empleada para cuantificar esta propiedad es el índice de imprimibilidad (Pr), definido matemáticamente como la relación entre el perímetro interno L y el área A del poro obtenido, mediante la expresión:

$$P_r = \frac{L^2}{16A} \tag{4.3}$$

Donde L es el perímetro medido y A el área del poro analizado. Este índice describe la circularidad o distorsión geométrica del poro impreso: Pr = 1 corresponde a un poro perfectamente cuadrado y, por tanto, a una alta fidelidad geométrica. Cuando Pr < 1, el poro tiende a ser más redondeado por la fusión parcial de los filamentos; Pr > 1 indica una deformación alargada o irregular.

Para el ensayo se imprime un patrón reticular bidimensional (habitualmente dos capas de filamentos cruzados) con la biotinta que se evalúa. El andamio se

fotografía y se analiza con software de procesamiento de imágenes, como ImageJ, para obtener el perímetro y el área de varios poros internos. Con estos datos se calcula el valor promedio de Pr, que refleja la capacidad de la biotinta para reproducir las dimensiones planificadas en el diseño digital. En la práctica, valores cercanos a la unidad se consideran indicativos de una impresión precisa y de buena calidad estructural (85).

Diversos estudios han empleado esta metodología para comparar la fidelidad de diferentes biotintas y condiciones de impresión. Ouyang et al. (2016) (86) introdujeron este índice como parámetro de evaluación para determinar la gelificación y estabilidad de biotintas basadas en hidrogeles. Posteriormente, Machour et al. (2022) (87) y Miklosic et al. (2025) (88) aplicaron el cálculo de Pr a estructuras reticulares impresas con distintas formulaciones, reportando que valores de Pr próximos a 1 se correlacionan con una elevada precisión geométrica y uniformidad del patrón impreso.

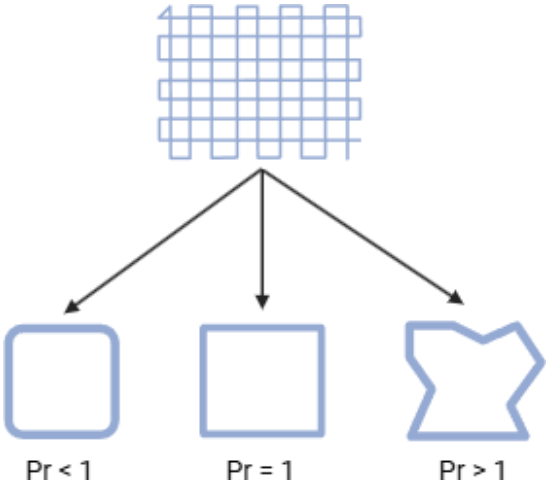


Figura 4.6: Representación esquemática del índice de imprimibilidad (Pr) empleado en la prueba de fidelidad de forma, parámetro cuantitativo utilizado para determinar la precisión geométrica y la estabilidad estructural de biotintas en procesos de bioimpresión 3D por extrusión.

V. Materiales y métodos

5.1 Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental de una vía, en el cual la variable independiente fue la concentración de quitosano en la formulación de la biotinta (0 %, 0.5 %, 1 %, 2 % y 3 % p/v). Como variables dependientes se evaluaron el factor de colapso del filamento, el índice de imprimibilidad (Pr) y el porcentaje de degradación de los andamios bioimpresos.

Cada ensayo experimental se realizó por triplicado (n = 3), reportándose los resultados como media ± desviación estándar. Para cada formulación se realizaron bioimpresiones independientes, cada una de los cuales constituyó una réplica experimental utilizada para la evaluación del factor de colapso y el índice de imprimibilidad y la fabricación de 3 andamios independientes para el porcentaje de degradación.

5.2 Materiales

Se emplearon ácido clorhídrico (HCl, 258148, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e hidróxido de sodio (NaOH, 567530, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como reactivos principales para los tratamientos químicos. El quitosano fue obtenido a partir de exuvias de *Hermetia illucens* en el Laboratorio de Química de la Vida (LAVI-UPCH). Para la formulación de biotintas se utilizaron gelatina tipo B (G9391, Sigma-Aldrich), alginato de sodio (A2033, Sigma-Aldrich), ácido acético glacial (Merck, Alemania) y lactato de calcio (1086888, Sigma-Aldrich).

Las estructuras empleadas en la caracterización del colapso de filamento fueron fabricadas mediante impresión 3D por estereolitografía enmascarada (MSLA), utilizando resina fotopolimérica transparente (UV Resin, Anycubic, China).

La bioimpresión se realizó con una bioimpresora BIO X (Cellink, Suecia), empleando jeringas de 3 mL acopladas a boquillas de calibre 22G (diámetro

interno aproximado de 410 μm). Las impresiones se efectuaron sobre placas Petri estériles, utilizadas como sustrato para la deposición y posterior caracterización de los andamios.

5.3 Obtención de quitosano

La metodología empleada para la obtención de quitosano a partir de exuvias de Hermetia illucens corresponde a una variación de protocolos previamente reportados para biomasa derivada de insectos (89), (90), (91). Dichos procedimientos fueron adaptados en función de la materia prima utilizada y de las condiciones experimentales del presente estudio, particularmente en lo referente a las relaciones sólido: líquido, tiempos de reacción y condiciones operativas, con el objetivo de optimizar la eficiencia del proceso y asegurar su reproducibilidad.

5.3.1 Preparación de la materia prima

Las exuvias pupales de H. illucens fueron sometidas a un proceso de limpieza para eliminar restos orgánicos y partículas externas, siguiendo metodologías reportadas para biomasa derivada de insectos (89). El lavado se realizó mediante inmersión en etanol seguido de enjuague con agua destilada. Después, las muestras se secaron en estufa a 55 ± 5 °C durante 24 h o hasta alcanzar peso constante, definido como una variación menor a ±0.01 g entre mediciones consecutivas. El material seco se trituró mecánicamente hasta obtener trozos de apariencia homogénea, lo que se verificó de forma cualitativa mediante inspección visual: ausencia de fragmentos macroscópicos irregulares y partículas de tamaño reducido y relativamente uniforme. No se realizó tamizado con control granulométrico específico, pero el procedimiento de molienda fue el mismo para todas las muestras, con el fin de mantener condiciones reproducibles en las etapas posteriores.

5.3.2 Desmineralización

El material molido se sometió a desmineralización ácida para eliminar los compuestos minerales, principalmente carbonato de calcio. Se empleó una solución de HCl 1 M en una relación sólido: líquido de 1:10 (m/v), manteniendo la reacción durante 1 h a 25 °C bajo agitación constante de 300 rpm. Estas condiciones se basaron en protocolos reportados (90), y se adaptaron en este estudio a las exuvias de *H. illucens* con el objetivo de optimizar la eficiencia del proceso. Tras la reacción, la suspensión se filtró al vacío con papel filtro Whatman N.° 1, y el sólido obtenido se lavó con agua destilada y se neutralizó con NaOH hasta pH 7.

5.3.3 Desproteinización

El material desmineralizado se trató con una solución de NaOH 1 M en una relación sólido:líquido de 1:25 (m/v), a 80 ± 2 °C durante 24 h y con agitación constante de 350 rpm, con el fin de eliminar la fracción proteica asociada a la quitina. Bajo estas condiciones, las proteínas estructurales son solubilizadas, permitiendo su separación de la matriz polisacárida. Tras el tratamiento, el material fue filtrado al vacío, neutralizado con HCl hasta pH 7 y lavado con agua destilada hasta la eliminación de residuos alcalinos (91).

5.3.4 Secado de la quitina

La quitina obtenida fue secada en estufa a 55 ± 5 °C durante 24 a 48 h hasta alcanzar peso constante, asegurando la eliminación de humedad residual y su estabilidad para la etapa de desacetilación (92).

5.3.5 Desacetilación y purificación del quitosano

La quitina seca fue sometida a desacetilación mediante tratamiento con NaOH al 50 % (p/v), empleando una relación sólido: líquido de 1:30 (m/v), a 90 ± 2 °C durante 3 horas bajo agitación constante de 350 rpm. Este proceso promueve la

eliminación de los grupos acetilo de la quitina, generando grupos amino libres característicos del quitosano. Las condiciones empleadas favorecen una conversión eficiente del polímero, manteniendo un equilibrio entre el grado de desacetilación y la preservación de la estructura. Finalizada la reacción, el material fue lavado con agua destilada hasta alcanzar pH neutro, enjuagado con etanol para la eliminación de impurezas orgánicas y secado a 105 °C hasta peso constante (89), (90).

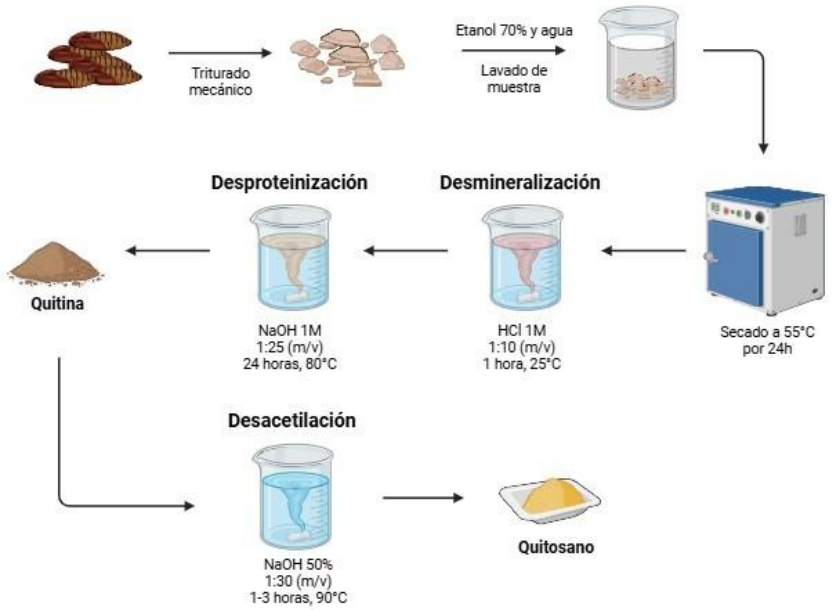


Figura 5.1: Extracción de quitosano a partir de exuvias de *Hermetia illucens*.

5.4 Caracterización del quitosano

La conversión de quitina a quitosano fue evaluada mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) siguiendo la norma ASTM F2103 (93). Para el análisis, las muestras fueron preparadas mediante la técnica de pastilla de bromuro de potasio (KBr), en la cual el material seco y finamente pulverizado fue mezclado homogéneamente con KBr grado espectroscópico en una proporción aproximada de 1:100 (m/m), y posteriormente comprimido hasta formar una pastilla transparente. Los espectros fueron obtenidos en un equipo Perkin Elmer (modelo Frontier), en el rango de 4000–400 cm^{-1}, con una resolución de 4 cm^{-1} y 16 barridos por muestra. El análisis se centró en la identificación de las bandas características de los grupos amida I (~1660 cm^{-1}) y

amida II (~1550 cm^{-1}), así como en la aparición de la banda asociada a grupos amino (~3450 cm^{-1}), indicativa del proceso de desacetilación.

El Grado de Desacetilación (DD%) se determinó cuantitativamente utilizando el método de relación de intensidades propuesto por Brugnerotto et al. (94), empleando la relación entre la banda de la amida III a 1320 cm^{-1} (banda de medición) y la banda de flexión del grupo CH_2 a 1420 cm^{-1} (banda de referencia interna), según la Ecuación 5.1:

$$DD\% = 100 - \frac{\frac{A_{1320}}{A_{1420}} - 0{,}3822}{0{,}0313} \quad (5.1)$$

Donde A_{1320} y A_{1420} corresponden a las absorbancias en los respectivos números de onda. El procesamiento de los espectros se realizó utilizando el software PerkinElmer Spectrum.

5.5 Preparación de biotintas

Las biotintas fueron formuladas utilizando alginato de sodio al 1.5 % (m/v) y gelatina al 1.5 % (p/v) como base polimérica, ambos preparados de manera conjunta. Por otro lado, el quitosano fue disuelto en ácido acético al 1 % (v/v) en una relación 1:1 (m/v), preparándose soluciones a concentraciones de 0.5, 1, 2 y 3 % (p/v). Las soluciones fueron preparadas bajo agitación magnética a 250 rpm a 40 °C hasta obtener mezclas homogéneas, definidas como aquellas sin presencia de agregados visibles y con apariencia uniforme. Finalmente, las formulaciones se mezclaron y las biotintas resultantes fueron cargadas en jeringas de 3 mL en condiciones asépticas, asegurando su uso inmediato en el proceso de bioimpresión.

5.6 Bioimpresión de andamios

Los andamios se fabricaron mediante bioimpresión por extrusión para evaluar la imprimibilidad de las formulaciones desarrolladas. Se establecieron rangos operativos de presión de extrusión (20–150 kPa) y de velocidad de

desplazamiento (1–17 mm/s), parámetros cuya interacción define el factor de expansión del filamento y la resolución de la estructura. La temperatura se mantuvo constante en 25 °C para estandarizar el comportamiento de las biotintas durante la extrusión y reducir las variaciones de flujo durante las pruebas. Con estos valores se identificó, para cada formulación, una ventana de procesamiento adecuada, con flujo continuo e integridad geométrica de los andamios obtenidos.

5.7 Caracterización de los andamios bioimpresos

La caracterización de los andamios bioimpresos permitió relacionar el comportamiento del material con su estabilidad y su fidelidad geométrica. Se obtuvo información cuantitativa sobre la estabilidad del filamento, la reproducibilidad de la impresión y la precisión geométrica, además de la respuesta de los andamios frente al medio acuoso. La comparación entre las dimensiones teóricas del diseño y las obtenidas experimentalmente permitió establecer la fidelidad del proceso de manufactura aditiva.

5.7.1 Prueba de colapso de filamento

La prueba de colapso de filamento se aplicó para evaluar la capacidad de la biotinta de mantener su estructura tras la extrusión. Se imprimió un filamento entre pilares con separaciones de 1, 2, 4, 8 y 16 mm, y se registró la deformación del segmento suspendido. El factor de colapso (Cf) se determinó con la siguiente expresión. El grado de colapso (C_f) se determinó mediante:

$$C_f = \frac{A_r}{A_t}\, x\, 100 \tag{5.2}$$

Donde:

- C_f: porcentaje de colapso del filamento,
- A_r: área real del filamento medida experimentalmente,

- A_t: área teórica según el modelo digital.

Un valor de C_f cercano al 100 % indica una menor deformación del filamento y, por tanto, una mayor estabilidad estructural frente al colapso. Por el contrario, valores menores indican una mayor deformación del segmento suspendido conforme aumenta la separación entre los pilares (95), (96). Debido a que el valor de C_f depende de la formulación del material y de las condiciones de impresión, en el presente estudio se estableció de manera operativa un umbral de ($C_f \geq 80$ %) para considerar que el filamento presenta una estabilidad geométrica relativa frente a la deformación.

5.7.2 Evaluación de fidelidad de forma de los andamios bioimpresos

La fidelidad de forma se evaluó mediante la comparación entre la geometría del diseño CAD y la estructura impresa, analizando las dimensiones de los poros mediante microscopía óptica. El parámetro fue calculado como la relación entre el área real y el área teórica del poro.

El parámetro de fidelidad de forma (P_r) se calculó según:

$$P_r = \frac{L^2}{16A} \tag{5.3}$$

Donde:

- P_r: parámetro de fidelidad de forma,
- L: perímetro del poro medido experimentalmente,
- A: área del poro medido experimentalmente.

Un valor de (Pr=1) representa una geometría de poro ideal, mientras que valores inferiores a 1 se asocian con el ensanchamiento del filamento y la pérdida de definición de los poros, y valores superiores a 1 con una mayor irregularidad de la geometría. De acuerdo con Ouyang et al. (86), se considera un rango de ($0.9 \leq Pr \leq 1.1$) como indicativo de una adecuada fidelidad geométrica, al encontrarse próximo al valor ideal de 1.

5.7.3 Evaluación del índice de degradabilidad de los andamios bioimpresos

La degradabilidad de los andamios fue evaluada mediante un ensayo de degradación hidrolítica en PBS (pH 7.4) a 37 ± 1 °C. Previamente al ensayo, los andamios bioimpresos fueron sometidos a un proceso de reticulación por inmersión en una solución de lactato de calcio al 2 % (p/v) durante 2 min a 25 °C, con el fin de estabilizar la estructura impresa. Las muestras fueron analizadas en intervalos de 1, 3, 7 y 14 días. En cada punto, fueron lavadas, secadas a 25 ± 2 °C hasta peso constante y pesadas para determinar la pérdida de masa, como indicador del grado de degradación.

El porcentaje de degradación (D_t) se calculó según:

$$D_t = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \times 100 \tag{5.4}$$

Donde:

- D_t: porcentaje de degradación al tiempo t,
- W_0: peso inicial del andamio seco,
- W_t: peso del andamio seco después del tiempo t.

Este procedimiento permitió determinar la estabilidad estructural de los andamios y su comportamiento frente a la hidrólisis bajo condiciones *in vitro* bajo las condiciones de la norma ASTM F1635 (97).

5.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para el factor de colapso del filamento (C_f), el índice de imprimibilidad (Pr) y la variación de masa durante el ensayo de degradación se expresaron como media ± desviación estándar. Para evaluar el factor de colapso del filamento (C_f), se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), considerando como factores la concentración de quitosano y la distancia de separación entre los pilares, así como su interacción. Para el índice de imprimibilidad (Pr), se realizó un análisis de varianza de una vía

(ANOVA), considerando como factor la formulación. Para el ensayo de degradación, se realizó un análisis de varianza de dos vías, considerando como factores la formulación y el tiempo de incubación, así como su interacción. Cuando se identificaron diferencias estadísticamente significativas, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey para determinar entre qué grupos se presentaron dichas diferencias. Se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0{,}05$, estableciéndose significancia estadística cuando $p < 0{,}05$. El análisis estadístico se realizó utilizando las tres réplicas experimentales correspondientes a cada combinación de factores evaluada.

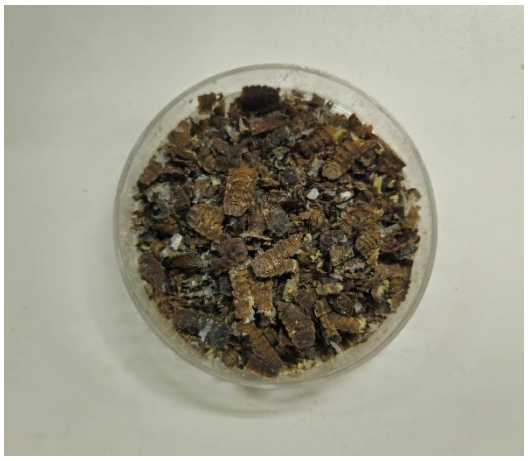
VI. Resultados

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos durante el proceso de extracción y obtención de quitosano, su posterior caracterización y los ensayos experimentales realizados con las formulaciones de biotinta propuestas. Los datos fueron organizados y analizados con el propósito de evaluar el desempeño de las mezclas en términos de sus propiedades físicas, morfológicas y de degradabilidad, conforme a la metodología descrita en el capítulo anterior.

En primer lugar, se exponen los resultados correspondientes al proceso de extracción de quitina, seguido de la obtención y caracterización del quitosano. Posteriormente, se detallan las formulaciones de biotintas y los resultados de las pruebas de caracterización inicial, tales como la fidelidad de forma y la estabilidad estructural, continuando con los ensayos de degradación y el análisis morfológico. Cada conjunto de resultados se presenta mediante los valores obtenidos y su respectiva representación gráfica, permitiendo comparar las distintas formulaciones evaluadas.

6.1 Extracción de quitina y obtención de quitosano

La extracción de quitina a partir de las exuvias pupales de *Hermetia illucens* permitió obtener un biopolímero de apariencia blanquecina y textura rígida. Las exuvias presentaron inicialmente una coloración marrón oscura, que disminuyó durante las etapas de tratamiento químico. Al finalizar los procesos de desproteinización y desmineralización, se obtuvo un material de tonalidad marfil.



(a) Exuvias de *H. illucens*.



(b) Exuvias trituradas.



(c) Quitina extraída.



(d) Quitosano obtenido.

Figura 6.1: Proceso de obtención del quitosano a partir de exuvias de *Hermetia illucens* (a) Exuvias pupales limpias; (b) exuvias trituradas; (c) quitina obtenida tras los procesos de desproteinización y desmineralización; y (d) quitosano resultante después de la desacetilación alcalina.

A partir de 30 g de exuvias secas se obtuvo un promedio de 9.72 ± 0.42 g de quitina purificada, correspondiente a un rendimiento del 32.4 ± 1.4 % con respecto a la masa inicial.

La conversión de quitina a quitosano se llevó a cabo mediante desacetilación alcalina con NaOH al 50 % (p/v) a 90 °C durante 3 h bajo agitación constante. Tras el lavado y neutralización, se obtuvo un polvo blanquecino de tacto ligeramente pegajoso al humedecerse, característico de quitosanos con bajo contenido de impurezas. La masa final de quitosano seco fue de 7.1 ± 0.3 g,

correspondiente a un rendimiento del 73.4 ± 2.1 % con respecto a la quitina inicial, lo que representa una eficiencia global del proceso de 23.6 % respecto a la biomasa original (Tabla 6.1).

Tabla 6.1: Resultados de extracción de quitina y obtención de quitosano

Muestra	Peso inicial	Extracción de quitina		Obtención de quitosano	
		Desproteinización	Desmineralización	Peso final de quitina	Desacetilación / Rendimiento
Exuvias de *H. illucens*	30.00 g	22.5 ± 0.8 g	20.47 ± 0.7 g	9.72 ± 0.42 g	7.1 ± 0.3 g / 23.6%

Durante el proceso se observó una variación en la fluidez del quitosano rehidratado. El material mantuvo su capacidad de disolución en ácido acético al 1 % y permitió la formación de soluciones homogéneas de apariencia traslúcida. Asimismo, el producto final presentó una apariencia blanquecina y una textura ligeramente pegajosa al humedecerse.

6.2 Caracterización del quitosano

El análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) permitió identificar las principales bandas presentes en el quitosano obtenido. El espectro presentado en la Figura 6.2) mostró una banda amplia alrededor de 3400 cm^{-1}, asociada a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O–H y N–H.

Entre 2920–2875 cm^{-1} se observaron bandas asociadas a las vibraciones de estiramiento C—H. La zona comprendida entre 1650 y 1560 cm^{-1} se identificaron bandas correspondientes a las regiones de amida I y grupos amino.

Para la determinación del grado de desacetilación (DD%), se utilizaron las señales ubicadas en 1420 cm^{-1} (deformación de CH_2) y 1320 cm^{-1}, mediante la relación de absorbancias A1320/A1420. A partir de esta relación se obtuvo un DD% promedio de 80,2 %.

En la región comprendida entre 1150 y 1020 cm^{-1} se observaron bandas asociadas a las vibraciones C–O–C y del enlace C–O. Asimismo, se identificó una banda alrededor de 895 cm^{-1}. En conjunto, el espectro presentó las principales señales correspondientes al material obtenido.

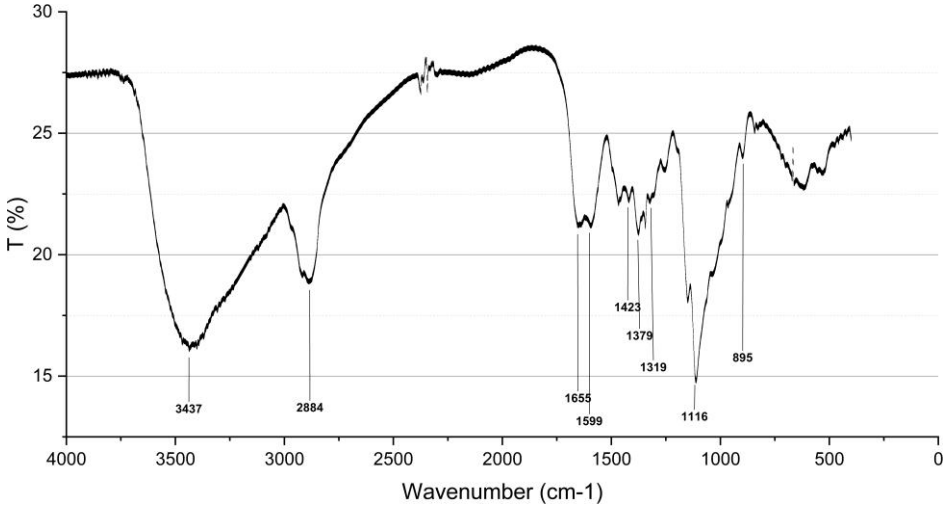


Figura 6.2: Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) del quitosano obtenido. Se observan las bandas características correspondientes a las vibraciones de estiramiento O–H y N–H ($\tilde{3}400$ cm^{-1}), C–H alifático (2920–2875 cm^{-1}), amida I (1650 cm^{-1}), amina II (1590 cm^{-1}) y C–O–C (1150–1020 cm^{-1}), asociadas a los grupos funcionales propios del biopolímero. La presencia de estas señales confirma la estructura polisacarídica del quitosano y la conservación de sus enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicos.

6.3 Evaluación del comportamiento estructural y estabilidad de los andamios bioimpresos

Para la fabricación de las muestras, se realizó un proceso previo de optimización de los parámetros de impresión con el fin de identificar las condiciones más adecuadas para cada formulación y garantizar la fidelidad geométrica y la estabilidad estructural de las estructuras impresas. Para ello, se llevaron a cabo múltiples pruebas preliminares variando parámetros como la presión de extrusión y la velocidad de avance, seleccionándose finalmente aquellos que permitieron obtener una extrusión continua, homogénea y con adecuada conservación de la forma. A continuación, se detallan las condiciones experimentales empleadas durante el proceso de bioimpresión 3D para las cinco variantes de hidrogeles compuestas por Quitosano (Ch), Alginato (Al) y Gelatina (Gel).

Como se observa en la Tabla 6.2, los parámetros de presión de extrusión y

velocidad de avance utilizados variaron entre las formulaciones. La presión empleada aumentó de 20 a 150 kPa, mientras que la velocidad de avance aumentó de 1 a 17 mm/s conforme se incrementó la concentración de quitosano de 0 a 3 %.

Por otro lado, los factores de colapso obtenidos para las distintas formulaciones de biotintas y separaciones de impresión se presentan en la Tabla 6.3.

Tabla 6.2: Parámetros de impresión optimizados para las muestras de hidrogel.

Muestra	P (kPa)	V (mm/s)	Nozzle	Temperatura	N° Rep.
0Ch1.5Al1.5Gel	20	1	22G	25°C	3
0.5Ch1.5Al1.5Gel	30	4	22G	25°C	3
1Ch1.5Al1.5Gel	70	7	22G	25°C	3
2Ch1.5Al1.5Gel	100	12	22G	25°C	3
3Ch1.5Al1.5Gel	150	17	22G	25°C	3

En general, los valores evidencian variaciones dependientes tanto de la concentración de quitosano como de las distancias en voladizo a las que son sometidas dichas formulaciones. Para la distancia de 1 mm de separación, las formulaciones 0.5Ch1.5Al1.5Gel y 3Ch1.5Al1.5Gel alcanzaron los factores de colapso más altos, con valores de 86,60 ± 1,69 y 97,56 ± 1,00, respectivamente. En esta misma distancia, las desviaciones estándar se mantuvieron bajas, indicando una buena repetibilidad en las mediciones.

En la distancia de 2 mm de separación, se observó un incremento en los factores de colapso para las formulaciones 0.5Ch1.5Al1.5Gel (91,57 ± 2,10) y 3Ch1.5Al1.5Gel (97,34 ± 0,59), mientras que la formulación 1Ch1.5Al1.5Gel presentó una disminución a 64,52 ± 0,84. En el caso de la distancia de 4 mm de separación, los valores de colapso más elevados correspondieron a las formulaciones 0.5Ch1.5Al1.5Gel y 1Ch1.5Al1.5Gel, con 90,41 ± 1,10 y 94,32 ± 0,90, respectivamente.

A 8 mm de separación, los factores de colapso mostraron una reducción general en la mayoría de las formulaciones, destacando 2Ch1.5Al1.5Gel con 84,52 ± 0,84 y 3Ch1.5Al1.5Gel con 84,15 ± 0,81. Finalmente, a la distancia de

16 mm se registraron los valores más bajos para las formulaciones con menor contenido de quitosano, siendo 38,37 ± 1,45 para 0.5Ch1.5Al1.5Gel y 42,72 ± 0,81 para 1Ch1.5Al1.5Gel, mientras que la formulación 3Ch1.5Al1.5Gel mantuvo un valor superior de 85,19 ± 0,71.

El análisis de varianza (ANOVA) de dos vías evidenció efectos estadísticamente significativos con respecto a las distancias medidas ($p < 0.001$), de la concentración de quitosano ($p < 0.001$) y de la interacción entre ambos factores ($p < 0.001$).

El análisis post hoc de Tukey mostró diferencias significativas entre el grupo control y los grupos experimentales ($p < 0,001$). No se observaron diferencias significativas entre las formulaciones 0,5Ch, 1Ch y 2Ch ($p > 0,05$). La formulación 3Ch presentó una diferencia significativa respecto a 1Ch ($p < 0,05$).

El análisis de la interacción entre la concentración de quitosano y la distancia de separación fue estadísticamente significativo ($p < 0,001$). En las separaciones de 8 y 16 mm, la formulación 3Ch presentó valores de factor de colapso superiores a los registrados por las formulaciones de menor concentración.

Tabla 6.3: Variación de los factores de colapso a diferentes distancias en voladizo

Separación (mm)	0Ch1.5Al1.5Gel	0.5Ch1.5Al1.5Gel	1Ch1.5Al1.5Gel	2Ch1.5Al1.5Gel	3Ch1.5Al1.5Gel
1	0,00 ± 0,00	86,60 ± 1,69	96,44 ± 0,97	83,11 ± 0,89	97,56 ± 1,00
2	0,00 ± 0,00	91,57 ± 2,10	64,52 ± 0,84	79,16 ± 1,04	97,34 ± 0,59
4	0,00 ± 0,00	90,41 ± 1,10	94,32 ± 0,90	75,98 ± 0,97	77,27 ± 1,10
8	0,00 ± 0,00	62,21 ± 1,03	66,77 ± 0,96	84,52 ± 0,84	84,15 ± 0,81
16	0,00 ± 0,00	38,37 ± 1,45	42,72 ± 0,81	51,52 ± 1,37	85,19 ± 0,71

En las figuras (6.3–6.7) se observa que los valores del factor de colapso varían con la distancia de separación. A 16 mm, las formulaciones 0,5Ch y 1Ch presentaron valores de 38,37 ± 1,45 y 42,72 ± 0,81 %, respectivamente, mientras que las formulaciones 2Ch y 3Ch registraron 51,52 ± 1,37 y 85,19 ± 0,71 %, respectivamente.

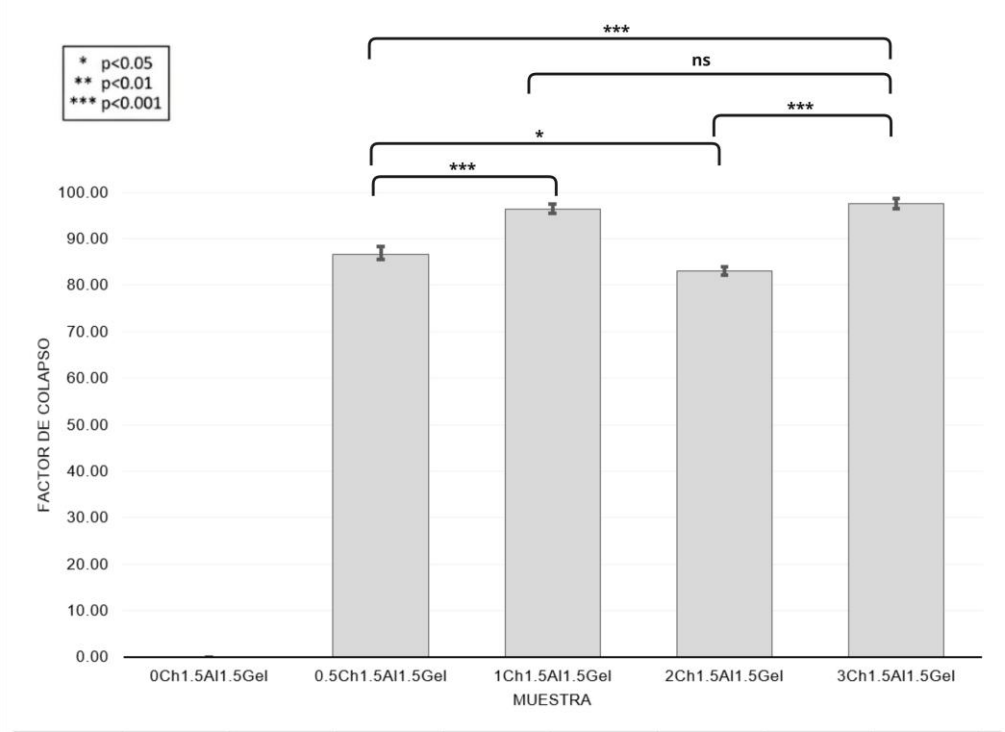


Figura 6.3: Comparación de factor de colapso de las muestras con diferentes concentraciones de quitosano a una distancia de 1 mm.

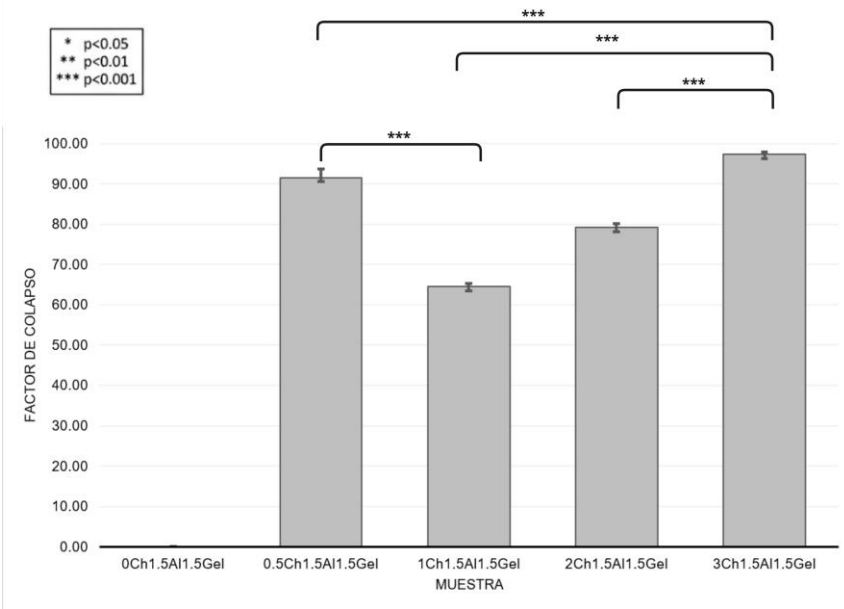


Figura 6.4: Comparación de factor de colapso de las muestras con diferentes concentraciones de quitosano a una distancia de 2 mm.

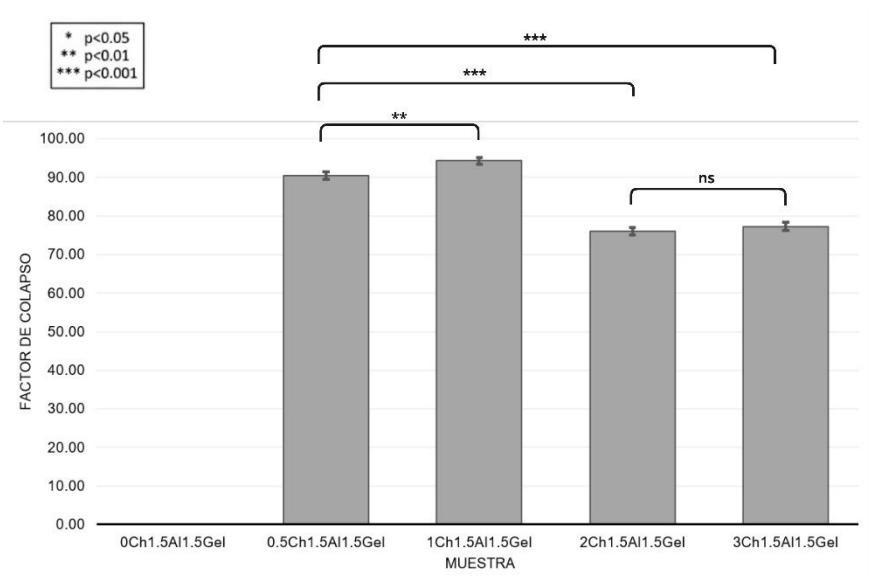


Figura 6.5: Comparación de factor de colapso de las muestras con diferentes concentraciones de quitosano a una distancia de 4 mm.

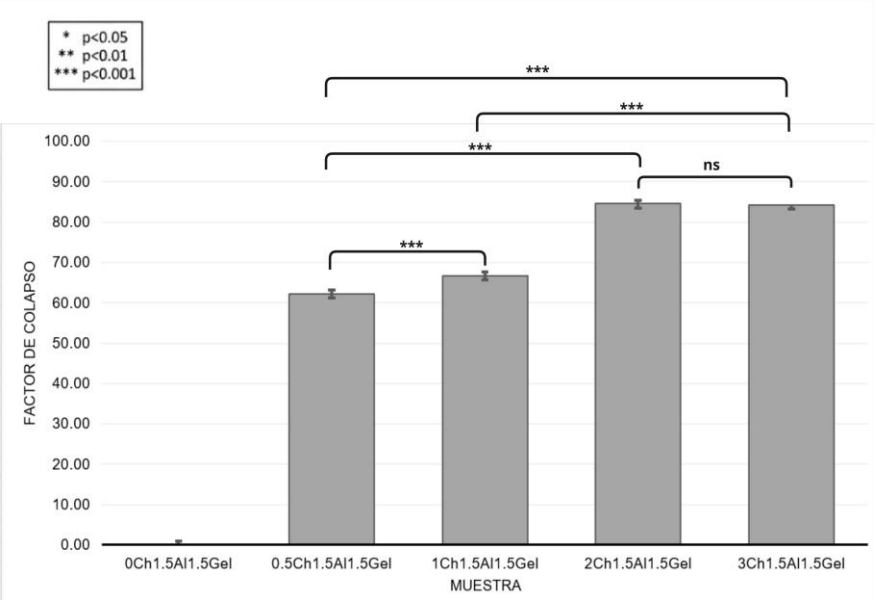


Figura 6.6: Comparación de factor de colapso de las muestras con diferentes concentraciones de quitosano a una distancia de 8 mm.

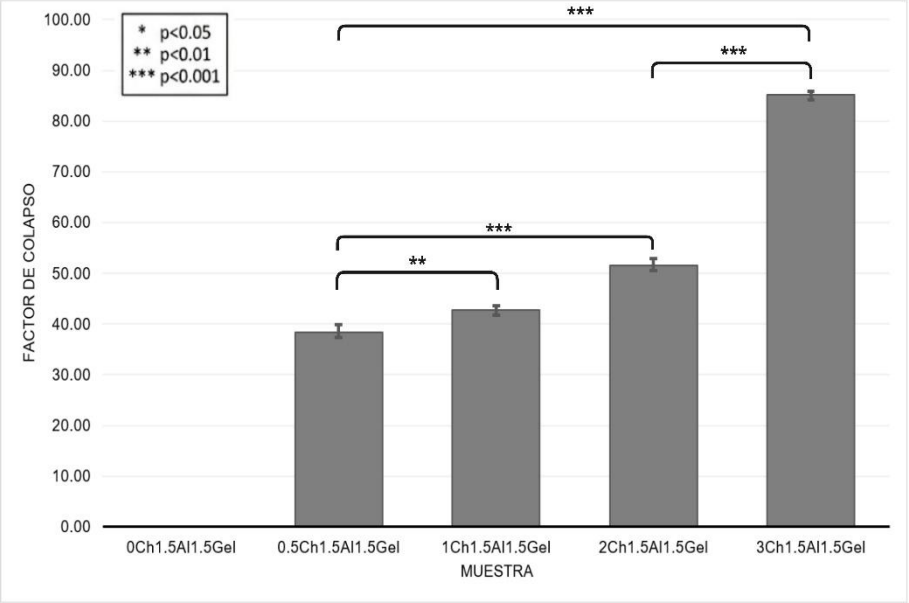
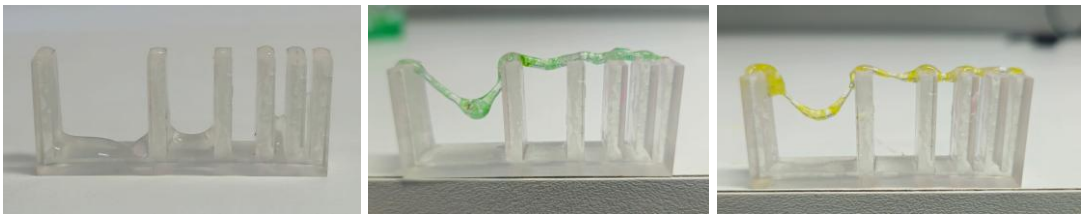
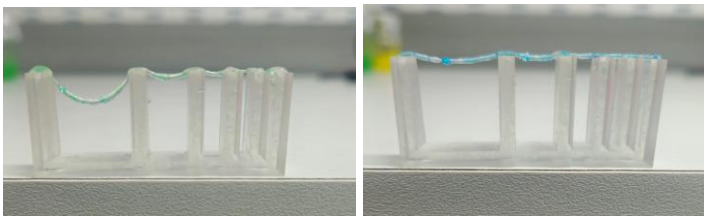


Figura 6.7: Comparación de factor de colapso de las muestras con diferentes concentraciones de quitosano a una distancia de 16 mm.

En la Figura 6.8 se muestran las estructuras obtenidas mediante el ensayo de colapso para las cinco formulaciones. La formulación 0Ch1.5Al1.5Gel presentó una deformación marcada del filamento suspendido. En la formulación 0.5Ch1.5Al1.5Gel se observó una menor deformación respecto al control, aunque permaneció una curvatura en la región central. La formulación 1Ch1.5Al1.5Gel presentó una deformación intermedia. En las formulaciones 2Ch1.5Al1.5Gel y 3Ch1.5Al1.5Gel se observaron filamentos con menor deflexión entre los pilares. La formulación 3Ch1.5Al1.5Gel presentó la menor deformación visual entre las muestras evaluadas.



(a) 0Ch1.5Al1.5Gel (b) 0.5Ch1.5Al1.5Gel (c) 1Ch1.5Al1.5Gel



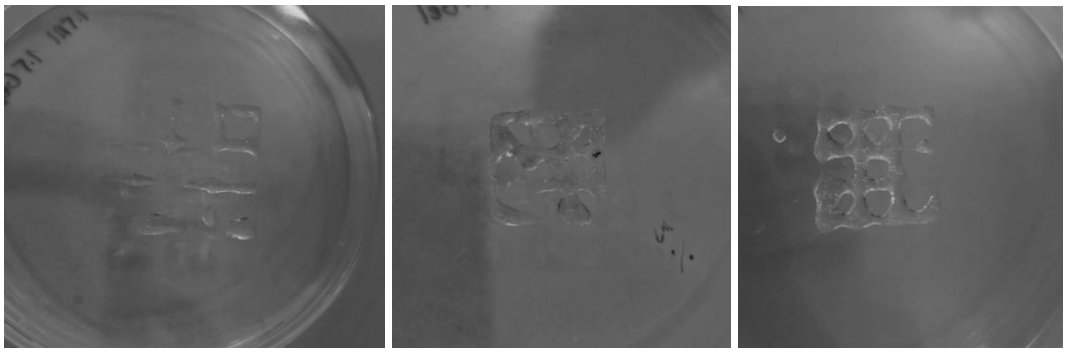
(d)2Ch1.5Al1.5Gel (e) 3Ch1.5Al1.5Gel

Figura 6.8: Imágenes del test de colapso realizado para las formulaciones (a) 0Ch1.5Al1.5Gel, (b) 0.5Ch1.5Al1.5Gel, (c) 1Ch1.5Al1.5Gel, (d) 2Ch1.5Al1.5Gel y (e)3Ch1.5Al1.5Gel. En cada caso, se observa la impresión de pilares suspendidos diseñados para evaluar la estabilidad estructural de las biotintas bajo condiciones de auto-soporte.

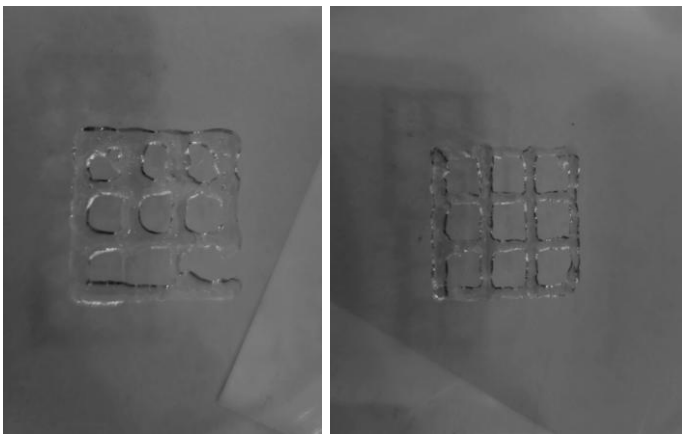
6.4 Evaluación de la reproducibilidad geométrica mediante el índice de imprimibilidad (Pr)

Para evaluar la capacidad de las biotintas para mantener la geometría del patrón diseñado durante el proceso de impresión, se determinó el índice de imprimibilidad (*Pr*) mediante la impresión de mallas cuadrangulares de 9 poros. Cada malla estuvo constituida por 4 líneas verticales y 4 líneas horizontales, distribuidas uniformemente en un área de 15 × 15 mm y con una separación equidistante entre líneas. El patrón se imprimió en dos capas, disponiendo las líneas horizontales en la primera capa y las líneas verticales en la segunda. Para el proceso de impresión se estableció una altura de capa de 0.12 mm, mientras que la distancia entre la placa y la boquilla durante la impresión de la primera capa se mantuvo en 0.12 mm, equivalente a la altura de capa. Este ensayo permitió cuantificar la reproducibilidad geométrica de las formulaciones, considerando el grado de deformación de los poros y la definición de los filamentos depositados. Las impresiones se realizaron manteniendo condiciones de extrusión, temperatura y velocidad óptimas para cada formulación, con el fin de asegurar que las variaciones observadas se deban exclusivamente a la composición de las biotintas y se tomaron en cuenta 3 poros por cada andamio impreso.

En la Figura 6.9 se presentan las mallas obtenidas para las cinco formulaciones. La formulación 0Ch1.5Al1.5Gel presentó poros irregulares y zonas de unión entre filamentos. En 0.5Ch1.5Al1.5Gel se observaron poros parcialmente definidos y deformaciones en algunas intersecciones. La formulación 1Ch1.5Al1.5Gel presentó filamentos más uniformes y poros con menor deformación visual. En 2Ch1.5Al1.5Gel se observaron filamentos continuos y poros de geometría aproximadamente cuadrangular. Finalmente, la formulación 3Ch1.5Al1.5Gel presentó poros con dimensiones y geometría próximas al patrón de diseño.



(a) 0Ch1.5Al1.5Gel (b) 0.5Ch1.5Al1.5Gel (c) 1Ch1.5Al1.5Gel



(d) 2Ch1.5Al1.5Gel (e) 3Ch1.5Al1.5Gel

Figura 6.9: Imágenes representativas de las mallas bioimpresas utilizadas para la determinación del índice de imprimibilidad (Pr) en diferentes formulaciones de biotintas a base de quitosano (Ch), alginato (Alg) y gelatina (Gel).

El análisis de los valores de Pr mostró diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones (ANOVA, $p < 0,05$). La formulación

1.5Al1.5Gel presentó un valor promedio de 0,65 ± 0,15, mientras que las formulaciones 0.5Ch1.5Al1.5Gel, 1Ch1.5Al1.5Gel y 2Ch1.5Al1.5Gel presentaron valores de 0,75 ± 0,10, 0,81 ± 0,13 y 0,88 ± 0,04, respectivamente. La formulación 3Ch1.5Al1.5Gel presentó el mayor valor de Pr, con 1,01 ± 0,006. La prueba post hoc de Tukey mostró diferencias significativas entre la formulación 3Ch1.5Al1.5Gel y las formulaciones de menor concentración evaluadas.

Tabla 6.4: Valores del índice de imprimibilidad (*Pr*) de cada formulación.

Formulación	**Índice de Imprimibilidad (*Pr*)**
1.5Al1.5Gel	0,65 ± 0,15
0.5Ch1.5Al1.5Gel	0,75 ± 0,10
1Ch1.5Al1.5Gel	0,81 ± 0,13
2Ch1.5Al1.5Gel	0,88 ± 0,04
3Ch1.5Al1.5Gel	1,01 ± 0,006

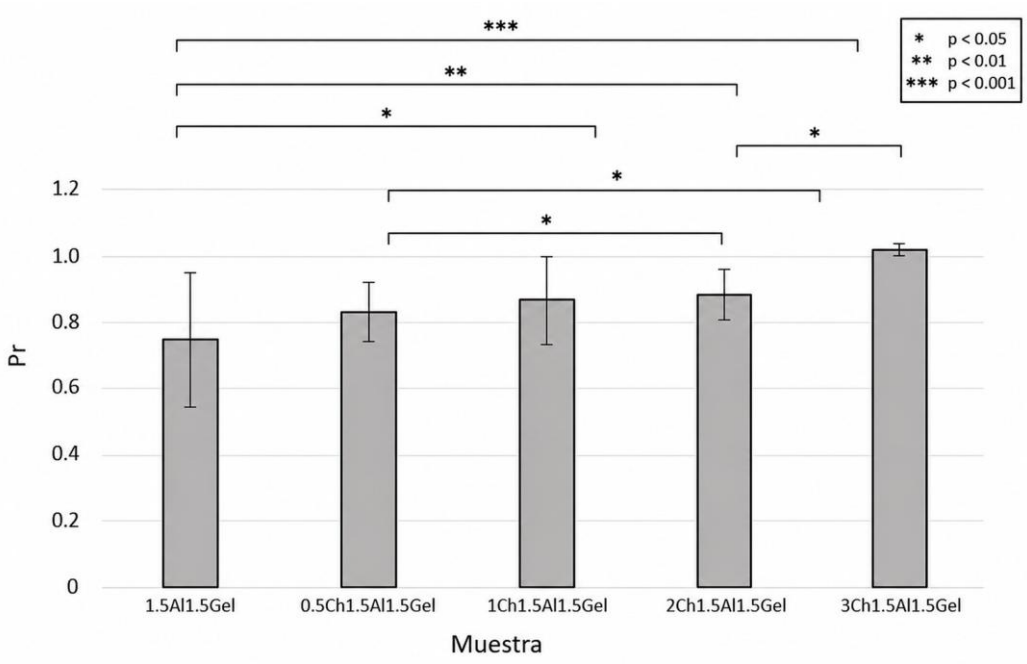


Figura 6.10: Comparación de factor de imprimibilidad (Pr) de las muestras con diferentes concentraciones de quitosano.

6.5 Evaluación del comportamiento de degradación de las biotintas reticuladas

Con el objetivo de determinar la estabilidad estructural de las biotintas bajo

condiciones acuosas, se realizó un ensayo de degradación en medio líquido durante un periodo de 14 días, manteniendo constantes las condiciones de temperatura, pH fisiológico y las concentraciones base de alginato y gelatina. El análisis de varianza de dos vías (ANOVA) aplicado a los datos recolectados reveló que tanto el factor de las formulaciones como el factor de los días transcurridos, así como la interacción entre ambos, ejercen un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.001$) sobre la variación de masa de los hidrogeles. De acuerdo con lo reportado en la Tabla 6.5, al inicio del ensayo (día 0), todas las formulaciones presentaron un estado de homogeneidad estadística ($p > 0.05$) con pesos promedio situados entre 9.83 g y 10.03 g, estableciendo un punto de partida uniforme para evaluar el impacto de la incorporación de quitosano (Ch).

Durante los primeros dos días de inmersión se registró una disminución de masa en todas las formulaciones. Al segundo día, la formulación 1.5Al1.5Gel presentó una pérdida aproximada del 13 %, mientras que las formulaciones 0.5Ch1.5Al1.5Gel y 1Ch1.5Al1.5Gel presentaron pérdidas aproximadas del 9 % y 10 %, respectivamente. Las formulaciones 2Ch1.5Al1.5Gel y 3Ch1.5Al1.5Gel conservaron más del 98 % de la masa inicial.

Entre los días 3 y 7 se observó una disminución progresiva de la masa en todas las formulaciones. Al séptimo día, la formulación control presentó una masa de 5,33 g, mientras que las formulaciones 0.5Ch1.5Al1.5Gel y 1Ch1.5Al1.5Gel presentaron masas de 6,80 y 7,50 g, respectivamente. Las formulaciones 2Ch1.5Al1.5Gel y 3Ch1.5Al1.5Gel presentaron masas de 8,60 y 8,97 g.

Al día 14, la formulación control presentó una masa de 4,40 g, correspondiente a una pérdida de 55,2 % respecto a su masa inicial. Las formulaciones 0.5Ch1.5Al1.5Gel y 1Ch1.5Al1.5Gel presentaron pérdidas de 39,2 % y 31,0 %, respectivamente, mientras que las formulaciones 2Ch1.5Al1.5Gel y 3Ch1.5Al1.5Gel presentaron pérdidas de 18,8 % y 18,5 %. La prueba post hoc de Tukey mostró diferencias significativas entre los grupos evaluados y no se observaron diferencias significativas entre las formulaciones de 2 % y 3 % de quitosano ($p > 0,05$).

Tabla 6.5: Variación del peso de los hidrogeles respecto al tiempo

Muestra	0 días	1 día	2 días	3 días	5 días	7 días	14 días
1.5Al1.5Gel	10,40 ± 0,25	9,03 ± 0.25	8.27 ± 0,30	7.20 ± 0,2	6.20 ± 0.2	5.33 ± 0.15	4.40 ± 0.34
0.5Ch1.5Al1.5Gel	10,10 ± 0,15	9,53 ± 0.15	8.93 ± 0,15	8.30 ± 0.10	7.50 ± 0,21	6.80 ± 0.11	6.10 ± 0.12
1Ch1.5Al1.5Gel	10,00 ± 0,20	9,70 ± 0.10	9.30 ± 0,14	8,80 ± 0.10	8.10 ± 0.17	7.50 ± 0.19	6.90 ± 0.28
2Ch1.5Al1.5Gel	9,95 ± 0,15	9,80 ± 0.10	9.59 ± 0,17	9.36 ± 0.22	8.92 ± 0,10	8.60 ± 0.23	8.17 ± 0.14
3Ch1.5Al1.5Gel	9.90 ± 0,10	9,87 ± 0.07	9.77 ± 0,25	9.57 ± 0.15	9.27 ± 0.27	8.97 ± 0.05	8.07 ± 0.22

La Figura 6.11 muestra la variación de la masa de las formulaciones durante los 14 días de ensayo. Las formulaciones 1.5Al1.5Gel y 0.5Ch1.5Al1.5Gel presentaron una disminución más pronunciada durante los primeros días. Las formulaciones 1Ch1.5Al1.5Gel y 2Ch1.5Al1.5Gel mostraron una disminución progresiva de la masa, mientras que 3Ch1.5Al1.5Gel presentó la menor variación relativa durante el periodo evaluado. Al día 14, las masas registradas fueron 4,40; 6,10; 6,90; 8,17 y 8,07 g para las formulaciones 1.5Al1.5Gel, 0.5Ch1.5Al1.5Gel, 1Ch1.5Al1.5Gel, 2Ch1.5Al1.5Gel y 3Ch1.5Al1.5Gel, respectivamente.

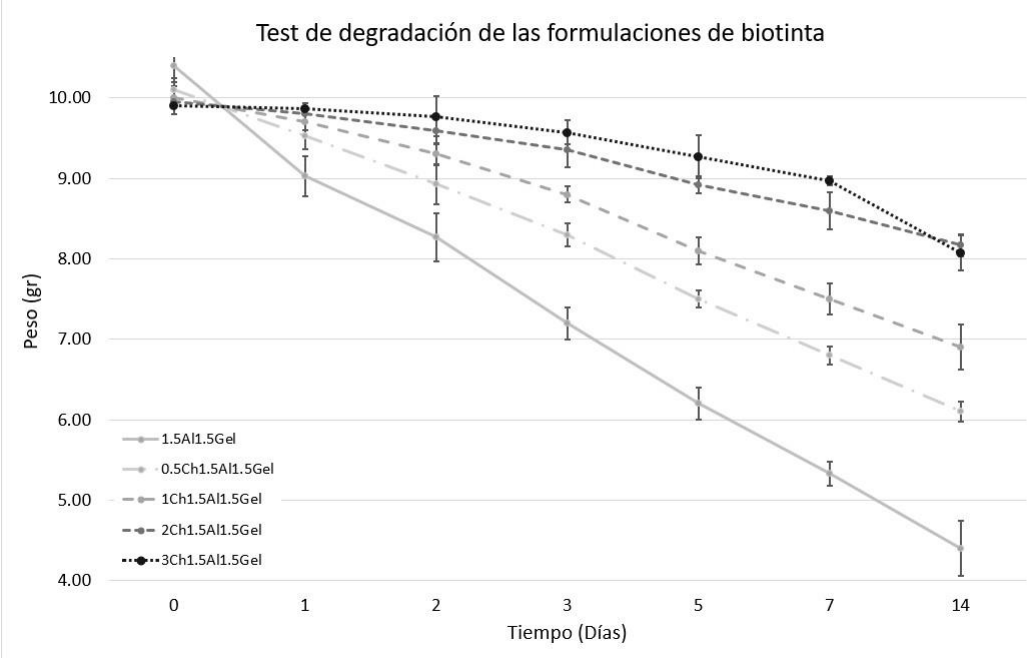


Figura 6.11: Evaluación del comportamiento de degradación de andamios con diferentes concentraciones de quitosano, expresado como pérdida de masa (g) en función del tiempo (días) bajo condiciones controladas de incubación durante 14 días.

VII. Discusión

La obtención de biopolímeros a partir de residuos de insectos, específicamente de las exuvias de *Hermetia illucens*, representa un avance significativo en la búsqueda de fuentes alternativas de bajo costo y menor impacto ambiental en comparación con las fuentes marinas tradicionales. En el presente estudio, el rendimiento de quitina del 32.4 % es notablemente elevado. Al contrastar este valor con el rango de 5–15 % reportado para diversos órdenes de insectos y el 20–30 % típico de crustáceos comerciales (90), se evidencia que las exuvias de dípteros en estadio de pupa poseen una matriz orgánica altamente eficiente para la extracción. Este rendimiento superior puede ser atribuido a la optimización del tratamiento alcalino convencional empleado. Aunque tendencias recientes sugieren el uso de solventes eutécticos profundos (DES) para una extracción "verde"(98), nuestros resultados (rendimiento global de quitosano del 23.6 %) demuestran que el método convencional, bajo condiciones controladas de temperatura y concentración, minimiza la depolimerización excesiva que a menudo reduce el rendimiento en métodos experimentales más complejos (99). El rendimiento de conversión de quitina a quitosano del 73.4 % confirma una desacetilación efectiva sin pérdida masiva de biomasa, un equilibrio difícil de lograr en procesos industriales.

La espectroscopía FTIR permitió la identificación cualitativa de los grupos funcionales característicos del quitosano, evidenciados por las bandas de amida I y II en 1650 y 1590 cm^{-1}. Asimismo, el grado de desacetilación (DD%) obtenido del 80.2 % sugiere una desacetilación efectiva del material extraído. En la literatura de ingeniería de tejidos, valores de DD superiores al 75 % han sido asociados con una mayor densidad de grupos amino protonables ($-NH^{+}_{3}$), lo cual favorece la formación de complejos de polielectrolitos (PEC) con polímeros aniónicos como el alginato (100). De manera similar, estudios previos han relacionado altos grados de desacetilación con propiedades de interés para aplicaciones biomédicas, como una mejor solubilidad y potencial interacción celular (101), (102). No obstante, dichas propiedades biológicas no fueron evaluadas experimentalmente en el presente estudio.

La evaluación de las biotintas mediante el factor de colapso (C_f) y el índice de

imprimibilidad (*Pr*) reveló una dependencia crítica de la concentración de quitosano. El hecho de que las formulaciones al 2 % y 3 % (p/v) presentaran un $C_f \geq 80$ % a distancias de 8 mm y un $C_f \geq 85$ % para la formulacion al 3 para una distancia de 16 mm sugiere que el quitosano de insecto actúa como un agente de refuerzo estructural eficaz. El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía ($p < 0{,}05$) confirmó diferencias significativas entre el control de alginato y las formulaciones con quitosano. La mejora observada en la estabilidad de los filamentos podría estar relacionada con cambios en las propiedades reológicas del sistema tras incorporar quitosano de *H. illucens*, como variaciones en la viscosidad o en la capacidad de recuperación estructural posterior a la extrusión. Los resultados no muestran una progresión estrictamente monotónica del factor de colapso entre formulaciones y distancias. Estas variaciones pueden atribuirse a la naturaleza viscoelástica de las biotintas y a pequeñas diferencias durante la extrusión y la deposición, como la continuidad o el diámetro efectivo del filamento. Aun así, no modifican la tendencia general: las formulaciones con menor concentración de quitosano presentaron una mayor reducción del Cf con la distancia, mientras que las de 2 % y 3 % mantuvieron mayor estabilidad estructural. Sin embargo, estos mecanismos no se evaluaron directamente mediante ensayos reológicos, por lo que confirmarlos requeriría estudios adicionales. Los valores de Pr cercanos a 1 respaldan de manera preliminar que la biotinta puede mantener la fidelidad geométrica requerida para andamios con arquitecturas de poro controladas, un requisito esencial para la difusión de nutrientes y el intercambio gaseoso en cultivos celulares tridimensionales (103), (104). En el caso del 2 %, el valor de Pr (0.88 ± 0.04) quedó ligeramente por debajo del rango considerado adecuado ($0.9 \leq \mathrm{Pr} \leq 1.1$).

Uno de los mayores desafíos del alginato en bioimpresión es su rápida degradación en medios fisiológicos. Los resultados muestran una mejora visible: mientras el control perdió 55.2 % de su masa al día 14, las formulaciones con 2 % y 3 % de quitosano mantuvieron una retención superior al 80 %. La prueba de Tukey indicó una divergencia significativa en la cinética de degradación a partir del día 7. Esta estabilidad mejorada podría estar asociada a interacciones electrostáticas entre los grupos carboxilo ($-COO^-$) del alginato y los grupos amino ($-NH^+$) del quitosano, favoreciendo la formación de una red polimérica

más estable. Esta red podría actuar como barrera física que limita la penetración de moléculas de agua y retrasa la lixiviación de las cadenas de alginato hacia el medio PBS. Este resultado es consistente con lo reportado por Xue et al. (105), quienes indicaron que el quitosano obtenido de *H. illucens* podía proporcionar el soporte estructural necesario durante las primeras fases de formación de un nuevo tejido, etapa en la que la tasa de degradación del andamio debe igualar la de formación de nueva matriz extracelular.

Desde una perspectiva económica preliminar, las formulaciones desarrolladas podrían ser una alternativa de bajo costo frente a las biotintas comerciales empleadas en bioimpresión 3D. Con una estimación basada únicamente en el consumo de reactivos utilizados en la extracción del quitosano y en la preparación de las formulaciones, se calculó un costo aproximado de producción de S/ 0.72 para la formulación con 2 % de quitosano y de S/ 0.97 para la de 3 %, considerando un volumen de 5 mL por jeringa. Un formato equivalente a un paquete comercial de tres jeringas de 5 mL tendría, por tanto, un costo estimado de aproximadamente S/ 2.16 y S/ 2.91, respectivamente. Estos valores sugieren una reducción considerable frente a los costos reportados para biotintas comerciales especializadas, lo que respalda el potencial de las exuvias de *Hermetia illucens* como fuente accesible y sostenible de biomateriales para ingeniería de tejidos. Esta estimación, sin embargo, contempla únicamente los costos directos de reactivos y materiales consumibles, y excluye personal, equipamiento, energía, esterilización, control de calidad y otros costos operativos de un proceso de manufactura a escala industrial o clínica.

Aunque el presente estudio establece una base preliminar para el uso de quitosano derivado de *Hermetia illucens* en bioimpresión, sus resultados deben interpretarse considerando que la caracterización se limitó principalmente a la imprimibilidad, la estabilidad estructural, la degradación y la caracterización química. Aún es necesario evaluar propiedades fundamentales para validar su potencial como biotinta; como señalan Murphy y Atala (106) , para que un andamio sea funcional debe mimetizar el microambiente de la matriz extracelular (MEC).

Una de las principales limitaciones corresponde a la ausencia de caracterización

reológica y mecánica. Si bien el factor de colapso y el índice de imprimibilidad permitieron evaluar indirectamente el desempeño de las formulaciones, no fue posible determinar parámetros como la viscosidad, tixotropía, módulos viscoelásticos o propiedades mecánicas de los andamios. Estudios futuros deberían incorporar ensayos reológicos y mecánicos bajo condiciones fisiológicas para relacionar estas propiedades con el comportamiento durante la extrusión y la estabilidad de los constructos.

Tampoco se realizaron ensayos de biocompatibilidad, por lo que no es posible determinar la respuesta celular frente a las formulaciones desarrolladas. Futuras investigaciones deberían evaluar su citocompatibilidad y, después, considerar estrategias de funcionalización que favorezcan la interacción célula-material. La incorporación de estudios reológicos, mecánicos y de biocompatibilidad permitiría superar las principales limitaciones identificadas y avanzar desde una evaluación preliminar hacia una validación más completa del potencial de estas formulaciones como biotintas.

VIII. Conclusiones

La espectroscopía FTIR confirmó la presencia de las bandas funcionales características del quitosano en el material obtenido a partir de la quitina de *Hermetia illucens*. El grado de desacetilación fue de 80.2 %, valor que indica una desacetilación eficiente de la quitina y corrobora la obtención de quitosano mediante el proceso de extracción empleado.

Durante la impresión, las formulaciones con concentraciones de quitosano ≥2 % p/v cumplieron el criterio de estabilidad estructural (Cf ≥80 %) a la distancia de 8 mm, y la formulación con 3 % presentó un Cf superior a 85 % a 16 mm, lo que indica una adecuada capacidad de autosoporte durante la deposición. La concentración de quitosano tuvo un efecto significativo en este comportamiento ($p < 0.05$).

La formulación con 3 % p/v de quitosano presentó un índice de imprimibilidad dentro del rango considerado adecuado ($0.9 \leq Pr \leq 1.1$, mientras que la formulación con 2 % p/v presentó un valor de 0.88 ± 0.04, ligeramente inferior a dicho rango, pero cercano a su límite inferior. También se identificaron diferencias significativas entre las formulaciones evaluadas ($p < 0.05$).

En cuanto a la degradación, la incorporación de quitosano favoreció la retención de masa de los andamios, con valores entre 81–83 % a los 14 días. Este efecto también fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

En conjunto, los resultados indican que el quitosano derivado de *H. illucens* tiene potencial para su uso en formulaciones de biotintas, con un desempeño que podría ser favorable en estabilidad del filamento, fidelidad de impresión y resistencia a la degradación. Las concentraciones ≥2 % p/v mostraron los resultados más consistentes dentro de las condiciones evaluadas.

En función de los resultados obtenidos, la hipótesis planteada se respalda parcialmente, debido a que el incremento de la concentración de quitosano mostró un efecto favorable sobre la estabilidad estructural, la fidelidad geométrica y la retención de masa de los andamios, particularmente en las formulaciones con concentraciones de 2 % y 3 % p/v. Sin embargo, estos

resultados corresponden a una evaluación física y estructural bajo las condiciones experimentales establecidas y no permiten establecer una validación biológica completa del material para aplicaciones en ingeniería de tejidos, debido a que no se realizaron ensayos de biocompatibilidad, citotoxicidad, viabilidad celular ni estudios *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, los hallazgos obtenidos respaldan el potencial preliminar del quitosano derivado de *H. illucens* como componente de una biotinta para bioimpresión por extrusión, mas no permiten afirmar su idoneidad biológica o funcional para aplicaciones de regeneración tisular.

IX. Referencias Bibliográficas

1. Ali Ostadfar. “Chapter 9 - Tissue Engineering of Cardiovascular System”. En: *Biofluid Mechanics*. Ed. por Ali Ostadfar. Academic Press, ene. de 2016, 323-339. Available from: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802408-9.00009-0.

2. Mark E. Furth y Anthony Atala. “Chapter 6 - Tissue Engineering: Future Perspectives”. En: *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*. Ed. por Robert Lanza, Robert Langer y Joseph Vacanti. Boston: Academic Press, ene. de 2014, 83-123. Available from: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00006-9.

3. Patrick Rider et al. “Bioprinting of tissue engineering scaffolds”. Journal of Tissue Engineering. 2018; 9: 2041731418802090. Available from: https://doi.org/10.1177/2041731418802090.

4. T. Woodfield et al. “5.14 Biofabrication in Tissue Engineering”. En: *Comprehensive Biomaterials II*. Ed. por Paul Ducheyne. Oxford: Elsevier, ene. de 2017, 236-266. Available from: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10221-8.

5. Vivian Lee et al. “Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting”. Tissue Engineering. Part C, Methods. 2014; 20(6): 473-484. Available from: https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2013.0335.

6. Ahmed Madni et al. “Recent advancements in applications of chitosan-based biomaterials for skin tissue engineering”. Journal of Bioresources and Bioproducts. 2021; 6(1): 11-25. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.01.002.

7. Xiaofeng Cui et al. “Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology”. Tissue Engineering. Part A. 2012; 18(11-12): 1304-1312. Available from: https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0543.

8. Ali Sadeghianmaryan et al. “Fabrication of chitosan/alginate/hydroxyapatite hybrid scaffolds using 3D printing and impregnating techniques for potential cartilage regeneration”. International Journal of Biological Macromolecules. 2022; 204: 62-75. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.201.

9. Aleksandra A. Golebiowska et al. “Integration of Technologies for Bone Tissue Engineering”. En: *Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative*

Medicine. Ed. por Rui L. Reis. Oxford: Academic Press, ene. de 2019, 243-259. Available from: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11063-3.

10. L. Roshini Yadav et al. “Chitosan-based 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering”. International Journal of Biological Macromolecules. 2021; 183: 1925-1938. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.215.

11. Teerawat Sukpaita et al. “Chitosan-Based Scaffold for Mineralized Tissues Regeneration”. Marine Drugs. 2021; 19(10): 551. Available from: https://doi.org/10.3390/md19100551.

12. Satar Yousefiasl et al. “Bioactive 3D-printed chitosan-based scaffolds for personalized craniofacial bone tissue engineering”. Engineered Regeneration. 2023; 4(1): 1-11. Available from: https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.09.005.

13. Hanieh Shokrani et al. “Cell-Seeded Biomaterial Scaffolds: The Urgent Need for Unanswered Accelerated Angiogenesis”. International Journal of Nanomedicine. 2022; 17: 1035-1068. Available from: https://doi.org/10.2147/IJN.S353062.

14. Cellink. Chitoink. en-US. Available from: https://www.cellink.com/product/chitoink/.

15. Cellink. CELLINK Bioink. en-US. Available from: https://www.cellink.com/prod uct/cellink-bioink/.

16. TheWell Bioscience. VitroINK® Bioinks Bioink| TheWell Bioscience. en-US. Available from: https://www.thewellbio.com/product/vitroink-bioinks/.

17. Allevi. Biomaterials & Bioinks - Allevi Shop. en-US. Available from: https://www.al levi3d.com/product-category/bioinks/.

18. P. Selcan Gungor-Ozkerim et al. “Bioinks for 3D bioprinting: an overview”. Biomaterials Science. 2018; 6(5): 915-946. Available from: https://doi.org/10.1039/c7bm00765e.

19. Jaciara Fernanda Gomes Gama et al. “Development and implementation of a significantly low-cost 3D bioprinter using recycled scrap material”. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2023; Volume 11 - 2023: Available from: https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1108396.

20. Alina Rodríguez et al. “Economía Circular y la impresión 3D: Biomateriales en la Sostenibilidad Industrial: Artículo de Revisión”. Revista de Investigaciones en Energía Medio Ambiente y Tecnología RIEMAT ISSN 2588-0721. 2025; 10: 56-67. Available from: https://doi.org/10.33936/riemat.v10i1.7680.

21. Ariel Riofrio y Haci Baykara “Environmental Impact of Chitosan Production from Black Soldier Flies Using Life Cycle Assessment”. Materials Science Forum. 2023; 1108: 163-171. Available from: https://doi.org/10.4028/p-10p7DY.

22. Clara Pedrazzani et al. “Black soldier fly as a New chitin source: Extraction, purification and molecular/structural characterization”. LWT. 2024; 191: 115618. Available from: https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115618.

23. A Antonov et al. “Production of chitin from dead Hermetia Illucens”. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2019; 315(4): 042003. Available from: https://doi.org/10.1088/1755-1315/315/4/042003.

24. Marguerite Rinaudo “Chitin and chitosan: Properties and applications”. Progress in Polymer Science. 2006; 31(7): 603-632. Available from: https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.

25. T. Budiati et al. Chitosan Extraction Methods of Black Soldier Fly Waste. UNISMA PRESS, 2024. Available from: https://books.google.com.pe/books?id=CD_8 EAAAQBAJ.

26. Khai Xi Ng. “Isolating chitin and derivatizing chitosan from dead adult black soldier fly”. other. UTAR, ene. de 2023. Available from: https://doi.org/10/1/fyp_FD_2023_NKX.pdf.

27. Abdelbasset El Hadrami et al. “Chitosan in Plant Protection”. Marine Drugs. 2010; 8(4): 968-987. Available from: https://doi.org/10.3390/md8040968.

28. "Jingru MENGMd. Iqbal Hassan KHANLei DAIAvik KHANXingye ANJunhua ZHANG Tanzina HUQYonghao NI" Çhao DUAN" "Xin MENG". Chitosan as A Preservative for Fruits and Vegetables: A Review on Chemistry and Antimicrobial Properties. 2019. Available from: https://doi.org/10.21967/jbb.v4i1.189.

29. Narumon Changsan y Chutima Sinsuebpol “Dry powder inhalation formulation of chitosan nanoparticles for co-administration of isoniazid and pyrazinamide”. Pharmaceutical Development and Technology. 2021; 26(2): 181-192. Available from: https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1852570.

30. Xiao Zhang et al. “The fabrication of the chitosan-based bioink for in vitro tissue repair and regeneration: A review”. International Journal of Biological Macromolecules. 2024; 257(Pt 2): 128504. Available from:

https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128504.

31. Luyu Zhou et al. “3D printing of high-strength chitosan hydrogel scaffolds without any organic solvents”. Biomater. Sci. 2020; 8(18): 5020-5028. Available from: https://doi.org/10.1039/D0BM00896F.

32. Jia Teoh et al. “3D Printing Personalized, Photocrosslinkable Hydrogel Wound Dressings for the Treatment of Thermal Burns”. Advanced Functional Materials. 2021; 31: Available from: https://doi.org/10.1002/adfm.202105932.

33. Panita Maturavongsadit et al. “Cell-Laden Nanocellulose/Chitosan-Based Bioinks for 3D Bioprinting and Enhanced Osteogenic Cell Differentiation”. ACS applied bio materials. 2021; 4(3): 2342-2353. Available from: https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01108.

34. Xiao-Yin Liu et al. “Integrated printed BDNF/collagen/chitosan scaffolds with low temperature extrusion 3D printer accelerated neural regeneration after spinal cord injury”. Regenerative Biomaterials. 2021; 8(6): rbab047. Available from: https://doi.org/10.1093/rb/rbab047.

35. Pierre Layrolle, Pierre Payoux y Stéphane Chavanas “Message in a Scaffold: Natural Biomaterials for Three-Dimensional (3D) Bioprinting of Human Brain Organoids”. Biomolecules. 2022; 13(1): 25. Available from: https://doi.org/10.3390/biom13010025.

36. Pratiksha Bramhe et al. “Natural and synthetic polymeric hydrogel: A bioink for 3D bioprinting of tissue models”. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2024; 101: 106204. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.106204.

37. Hao Liu et al. “A review of biomacromolecule-based 3D bioprinting strategies for structure-function integrated repair of skin tissues”. International Journal of Biological Macromolecules. 2024; 268: 131623. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131623.

38. Elena Alina Chiticaru y Mariana Ioniță “Commercially available bioinks

and state-of-the-art lab-made formulations for bone tissue engineering: A comprehensive review”. Materials Today Bio. 2024; 29: 101341. Available from: https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101341.

39. Aayush Prakash et al. “Polysaccharides as functional biomaterials in 3D bioprinting: Strategies for antimicrobial applications”. Next Materials. 2025; 9:

101255. Available from: https://doi.org/10.1016/j.nxmate.2025.101255.

40. Jessica Condi Mainardi, Kurosch Rezwan y Michael Maas “Genipin-crosslinked chitosan/alginate/alumina nanocomposite gels for 3D bioprinting”. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2022; 45(1): 171-185. Available from: https://doi.org/10.1007/s00449-021-02650-3.

41. Negin Khoshnood, John P. Frampton y Ali Zamanian “3D bioprinted alginate/chitosan-based sandwich-structured wound dressing with dual-drug release for enhanced skin regeneration”. International Journal of Biological Macromolecules. 2025; 332: 148428. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.148428.

42. Amanda C Juraski et al. “Investigation of novel carboxymethyl chitosan-based bioinks for 3D bioprinting of neural tissues”. Biomedical Materials. 2025; 20(3): 035036. Available from: https://doi.org/10.1088/1748-605X/add6f9.

43. Yueqi Lu et al. “A biocompatible double-crosslinked gelatin/ sodium alginate/dopamine/quaterniazed chitosan hydrogel for wound dressings based on 3D bioprinting technology”. International Journal of Bioprinting. 2023; 9(2): 689. Available from: https://doi.org/10.18063/ijb.689.

44. Upasna Upadhyay et al. “Development of an alginate–chitosan biopolymer composite with dECM bioink additive for organ-on-a-chip articular cartilage”. Scientific Reports. 2024; 14(1): 11765. Available from: https://doi.org/10.1038/s41598-024-62656-1.

45. Kurt W. Alt et al. “Evidence for stone age cranial surgery”. Nature. 1997; 387(6631): 360-360. Available from: https://doi.org/10.1038/387360a0.

46. M. J. Becker “Ancient "dental implants": a recently proposed example from France evaluated with other spurious examples”. The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. 1999; 14(1): 19-29.

47. Elia Marin, Francesco Boschetto y Giuseppe Pezzotti “Biomaterials and biocompatibility: An historical overview”. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2020; 108(8): 1617-1633. Available from: https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.a.36930.

48. R. Langer y J. P. Vacanti “Tissue engineering”. Science (New York, N.Y.) 1993; 260(5110): 920-926. Available from: https://doi.org/10.1126/science.8493529.

49. Dinglingge Cao y Jiandong Ding “Recent advances in regenerative

biomaterials". Regenerative Biomaterials. 2022; 9: rbac098. Available from: https://doi.org/10.1093/rb/rbac098.

50. Maj-Britt Buchholz et al. "Human breast tissue engineering in health and disease". EMBO Molecular Medicine. 2024; 16(10): 2299-2321. Available from: https://doi.org/10.1038/s44321-024-00112-3.

51. Qiwei Dong et al. "Polysaccharides, as biological macromolecule-based scaffolding biomaterials in cornea tissue engineering: A review". Tissue and Cell. 2022; 76: 101782. Available from: https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101782.

52. Andrew McCormack et al. "3D Printing in Suspension Baths: Keeping the Promises of Bioprinting Afloat". Trends in Biotechnology. 2020; 38(6): 584-593. Available from: https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.020.

53. Md Ahasan Habib y Bashir Khoda "Development of clay based novel bio-ink for 3D bio-printing process". Procedia Manufacturing. 2018; 26: 846-856. Available from: https://doi.org/10.1016/j.promfg.2018.07.105.

54. Falguni Pati et al. "Chapter 7 - Extrusion Bioprinting". En: *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*. Ed. por Anthony Atala y James J. Yoo. Boston: Academic Press, 2015, 123-152. Available from: https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800972-7.00007-4.

55. Wei Long Ng, Chee Kai Chua y Yu-Fang Shen "Print Me An Organ! Why We Are Not There Yet". Progress in Polymer Science. 2019; 97: 101145. Available from: https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2019.101145.

56. Mohammadmahdi Mobaraki et al. "Bioinks and bioprinting: A focused review". Bioprinting. 2020; 18: e00080. Available from: https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00080.

57. J Groll et al. "A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks". Biofabrication. 2018; 11(1): 013001. Available from: https://doi.org/10.1088/1758-5090/aaec52.

58. Matheus A. A. Resende, Eliana C. S. Rigo y Andrés Vercik "Printability of Bioinks: A Consolidated Definition for Additive Manufacturing". ACS Omega. 2025; 10(48): 58110-58122. Available from: https://doi.org/10.1021/acsomega.5c00727.

59. P. Selcan Gungor-Ozkerim et al. “Bioinks for 3D bioprinting: an overview”. Biomaterials science. 2018; 6(5): 915-946. Available from: https://doi.org/10.1039/c7bm00765e.

60. Girdhari Rijal “Bioinks of Natural Biomaterials for Printing Tissues”. Bioengineering. 2023; 10(6): Available from: https://doi.org/10.3390/bioengineering10060705.

61. Vida Zargar, Morteza Asghari y Amir Dashti “A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications”. ChemBioEng Reviews. 2015; 2(3): 204-226. Available from: https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cben.201400025.

62. Islem Younes y Marguerite Rinaudo “Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications”. Marine Drugs. 2015; 13(3): 1133-1174. Available from: https://doi.org/10.3390/md13031133.

63. Maria Lazaridou, Dimitrios N. Bikiaris y Dimitrios A. Lamprou “3D Bioprinted Chitosan-Based Hydrogel Scaffolds in Tissue Engineering and Localised Drug Delivery”. Pharmaceutics. 2022; 14(9): 1978. Available from: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091978.

64. Inmaculada Aranaz et al. “Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications”. Polymers. 2021; 13(19): Available from: https://doi.org/10.3390/polym13193256.

65. Inmaculada Aranaz et al. “Functional Characterization of Chitin and Chitosan”. Current Chemical Biology. 2009; 3: 203-230. Available from: https://doi.org/10.2174/187231309788166415.

66. Kuen Yong Lee y David J. Mooney “Alginate: properties and biomedical applications”. Progress in Polymer Science. 2012; 37(1): 106-126. Available from: https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.

67. Olivia Steiner y Jean-Philippe St-Pierre “Improving alginate printability with alternative cationic pre-crosslinkers: strontium-based bioinks and their impact on bioprinted cartilaginous tissues”. Bioprinting. 2026; 55: e00468. Available from: https://doi.org/10.1016/j.bprint.2026.e00468.

68. Joseph P. Bennett, Laura F. Robinson y Leonardo D. Gomez “Valorisation strategies for brown seaweed biomass production in a European context”. Algal Research. 2023; 75: 103248. Available from: https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103248.

69. Nima Farshidfar, Siavash Iravani y Rajender S. Varma “Alginate-Based Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine”. Marine Drugs. 2023; 21(3): Available from: https://doi.org/10.3390/md21030189.

70. Marguerite Rinaudo “Biomaterials based on a natural polysaccharide: alginate”. TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 2014; 17(1): 92-96. Available from: https://doi.org/10.1016/S1405-888X(14)70322-5.

71. Alvin Bacero Bello et al. “Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications”. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2020; 26(2): 164-180. Available from: https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0256.

72. Izeia Lukin et al. “Progress in Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering”. Pharmaceutics. 2022; 14(6): Available from: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061177.

73. Saad Asim et al. “Advances in gelatin bioinks to optimize bioprinted cell functions”. Advanced healthcare materials. 2023; 12(17): e2203148. Available from: https://doi.org/10.1002/adhm.202203148.

74. Hongwei Cao et al. “Gelatin-based biomaterials and gelatin as an additive for chronic wound repair”. Frontiers in Pharmacology. 2024; Volume 15 - 2024: Available from: https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1398939.

75. Andrea Schwab et al. “Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting”. Chemical Reviews. 2020; 120(19): 11028-11055. Available from: https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00084.

76. Zan Lamberger et al. “Advanced optical assessment and modeling of extrusion bioprinting”. Scientific Reports. 2024; 14(1): 13972. Available from: https://doi.org/10.1038/s41598-024-64039-y.

77. Ahasan Habib et al. “3D Printability of Alginate-Carboxymethyl Cellulose Hydrogel”. Materials. 2018; 11(3): 454. Available from: https://doi.org/10.3390/ma11030454.

78. Aida Cavallo et al. “Optimization of Gelatin and Crosslinker Concentrations in a Gelatin/Alginate-Based Bioink with Potential Applications in a Simplified Skin Model”. Molecules. 2025; 30(3): 649. Available from: https://doi.org/10.3390/molecules30030649.

79. 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.

80. Hillary Mndlovu et al. "A review of biomaterial degradation assessment approaches employed in the biomedical field". npj Materials Degradation. 2024; 8(1): 66. Available from: https://doi.org/10.1038/s41529-024-00487-1.

81. Yeganeh Dorri Nokoorani et al. "Fabrication and characterization of scaffolds containing different amounts of allantoin for skin tissue engineering". Scientific Reports. 2021; 11(1): 16164. Available from: https://doi.org/10.1038/s41598-021-95763-4.

82. Mojgan Ghanbari et al. "In vitro study of alginate–gelatin scaffolds incorporated with silica NPs as injectable, biodegradable hydrogels". RSC Advances. 2021; 11(27): 16688-16697. Available from: https://doi.org/10.1039/D1RA02744A.

83. Hatai Jongprasitkul et al. "Two-step crosslinking to enhance the printability of methacrylated gellan gum biomaterial ink for extrusion-based 3D bioprinting". Bioprinting. 2021; 25: e00185. Available from: https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00185.

84. Jun Yin, Dengke Zhao y Jingyi Liu "Trends on physical understanding of bioink printability". Bio-Design and Manufacturing. 2019; 2(1): 50-54. Available from: https://doi.org/10.1007/s42242-019-00033-y.

85. Gregory J. Gillispie et al. "The correlation between rheological properties and extrusion-based printability in bioink artifact quantification". Materials & Design. 2023; 233: 112237. Available from: https://doi.org/10.1016/j.matdes.2023.112237.

86. Liliang Ouyang et al. "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.

87. Majd Machour et al. "Print-and-Grow within a Novel Support Material for 3D Bioprinting and Post-Printing Tissue Growth". Advanced Science. 2022; 9: Available from: https://doi.org/10.1002/advs.202200882.

88. Gregor Miklosic et al. "Radical-free photopolymerizable composites of hyaluronic acid and gelatin for tissue engineering". Acta Biomaterialia. 2025; 197: Available from: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2025.03.017.

89. Jelena Milinkovic´ Budinčić et al. "Exuviae of Tenebrio molitor Larvae as a

Source of Chitosan: Characterisation and Possible Applications". Applied Sciences. 2025; 15(17): 9285. Available from: https://doi.org/10.3390/app15179285.

90. Micaela Triunfo et al. "Characterization of chitin and chitosan derived from Hermetia illucens, a further step in a circular economy process". Scientific Reports. 2022; 12(1): 6613. Available from: https://doi.org/10.1038/s41598-022-10423-5.

91. Anqi Xiong et al. "Extraction of Chitin from Black Soldier Fly (Hermetia illucens) and Its Puparium by Using Biological Treatment". Life. 2023; 13(7): 1424. Available from: https://doi.org/10.3390/life13071424.

92. Katarzyna Złotko et al. "Isolation of Chitin from Black Soldier Fly (Hermetia illucens) and Its Usage to Metal Sorption". Polymers. 2021; 13(5): 818. Available from: https://doi.org/10.3390/polym13050818.

93. Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications. Available from: https://store.astm.org/f2103-18.html.

94. J Brugnerotto et al. "An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization". Polymer. 2001; 42(8): 3569-3580. Available from: https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00713-8.

95. David Picado-Tejero et al. "3D Bioprinted Natural Hydrogels: Rheological Characterization, Cytotoxicity, and Printability Assessment of a Polysaccharide-Based Bioink". ACS omega. 2026; 11(2): 3115-3131. Available from: https://doi.org/10.1021/acsomega.5c09668.

96. 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.

97. Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants. Available from: https : //store.astm.org/f1635-16.html.

98. Ying Wang et al. "Efficient and green extraction of chitin from Hermetia illucens using deep eutectic solvents and its application for rapid hemostasis". Carbohydrate Polymers. 2025; 352: 123152. Available from: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.123152.

99. Thomas Hahn et al. “Purification of Chitin from Pupal Exuviae of the Black Soldier Fly”. Waste and Biomass Valorization. 2022; 13(4): 1993-2008. Available from: https://doi.org/10.1007/s12649-021-01645-1.

100. Qiongqiong Liu et al. “Preparation and Properties of 3D Printed AlginateChitosan Polyion Complex Hydrogels for Tissue Engineering”. Polymers. 2018; 10(6): 664. Available from: https://doi.org/10.3390/polym10060664.

101. Leslie John Ray Foster et al. “Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physiochemical, Material and Biological Properties”. PloS One. 2015; 10(8): e0135153. Available from: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135153.

102. Renie Kumala Dewi et al. “Chitosan from Black Soldier Fly (Hermetia Illucens) Pupae Increases Osteoblasts and Decreases Osteoclasts Post-Tooth Extraction: In vivo Study”. Journal of Oral Research. 2025; 14: 445-457. Available from: https://doi.org/10.17126/joralres.2025.037.

103. Cartwright Nelson et al. “3D Bio-Printability of Hybrid Pre-Crosslinked Hydrogels”. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(24): Available from: https://doi.org/10.3390/ijms222413481.

104. Xavier L. Tabil, Tate N. Cao y Xiongbiao Chen “On the Rheological Properties and Printability of Sodium Alginate–Carboxymethyl Chitosan Composite Solutions for Tissue Scaffold Printing”. Biopolymers. 2025; 116(6): e70050. Available from: https://doi.org/10.1002/bip.70050.

105. Zi-ang Yao et al. “Efficacy of chitosan and sodium alginate scaffolds for repair of spinal cord injury in rats”. Neural Regeneration Research. 2018; 13(3): 502. Available from: https://doi.org/10.4103/1673-5374.228756.

106. 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.