



Escuela de
Ciencia y Tecnología
ECyT_UNSAM

PROYECTO FINAL INTEGRADOR - INGENIERÍA BIOMÉDICA

Diseño y caracterización de andamios reabsorbibles para emular tejido óseo y estimular mecanismos de osificación

ESTUDIANTE: TOMÁS FEDERICO

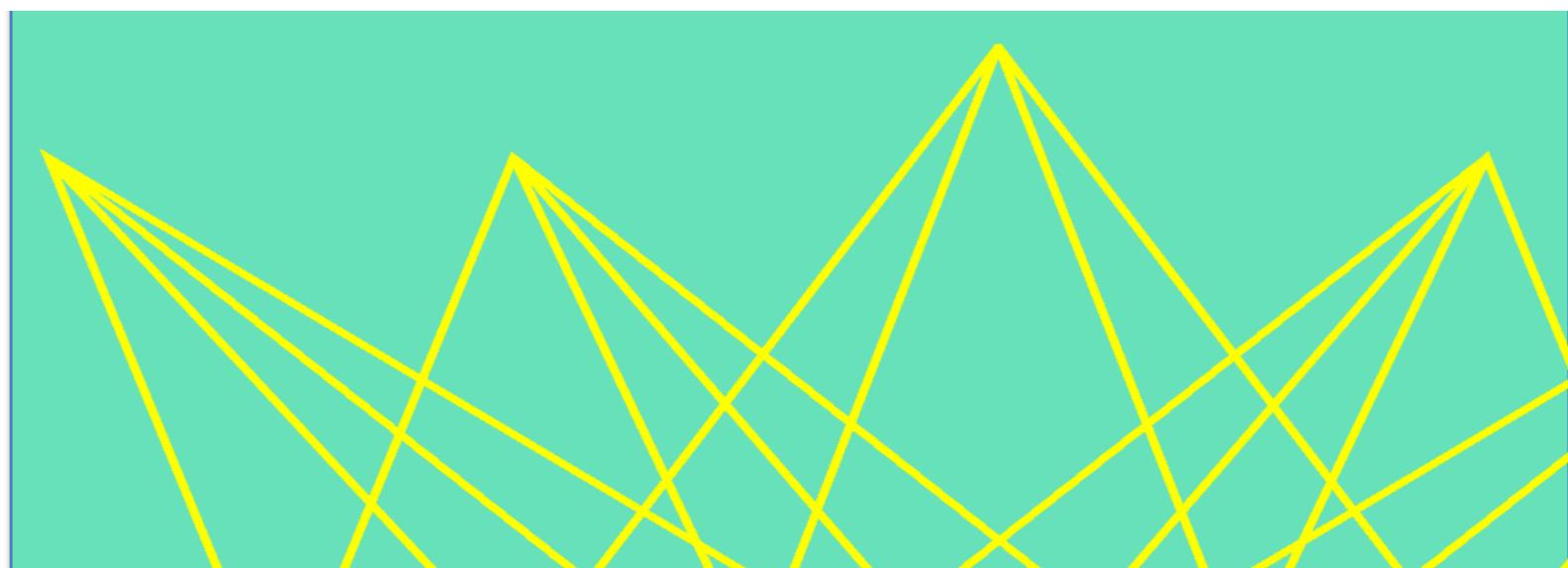
LEGAJO: CYT-5443

SUPERVISORA: Dra. Élide B. Hermida

CO-SUPERVISORA: Dra. Beatriz Aráoz

LUGAR DE TRABAJO: Lab3Bio

FECHA: Septiembre 2020



Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a la gente que posibilitó la realización de este trabajo y a aquellas personas que hicieron que sea un poco más sencillo transitar este camino para poder graduarme.

A Élida por abrirme las puertas a un hermoso grupo de trabajo del cual me enorgullece ser parte. Por brindar su profesionalismo, dedicación y paciencia para responder mis necesidades cuando tiene todo un universo de responsabilidades de las cuales hacerse cargo.

A Bea por estar presente, enseñarme y exigirme desde el primero hasta el último día de este proyecto. Su pasión por lo que hace es algo que motiva a cualquiera que la vea. Tuve el privilegio de haberla tenido como co-directora.

A toda la gente del Lab3Bio, que me brindó la posibilidad de compartir un espacio de trabajo en exceso amigable y en el que siempre encontrás a alguien disponible para interesarse por tu proyecto, responder tus preguntas o resolver tus problemas.

A los chicos de la FAN, al Museo de Ciencias Naturales, a Gabriela de CNEA, a Ezequiel del INTI, a Nayla de la Universidad de Mar del Plata y a la Universidad Politécnica de Catalunya, por compartirme su tiempo, espacio, conocimiento y herramientas para poder realizar este proyecto.

A la Universidad de San Martín, docentes, cargos directivos y personal administrativo de Relaciones Internacionales por ofrecer educación pública, gratuita y de calidad, por permitirme el sueño de viajar a Barcelona en el marco de un proyecto de investigación.

A mis compañeros y compañeras de la facultad, que fueron haciendo más ameno el trayecto.

A mi padre y madre que siempre me brindaron todo su apoyo y se rompieron el lomo para que yo pueda acceder a todas aquellas herramientas que hicieron posible que yo esté escribiendo estas palabras.

A mi familia y amigos que siempre están y siempre se ocuparon y preocuparon por mi bienestar.

A la chinita que es la mejor, que me despertó de la siesta, que fue oreja cuando estuve allá arriba y hombro cuando estuve allá abajo.

A todas las personas que me formaron y de alguna manera fueron parte de esto.

Índice

Resumen	5
1 Introducción	7
1.1 Contexto	7
1.2 Antecedentes	7
1.3 Hipótesis	9
1.4 Objetivos	10
2. Fundamentos	11
2.1 Biomateriales	11
2.2 Ingeniería de Tejidos	12
2.3 Tejido Óseo	13
2.4 Andamios	17
2.5 PHBV	19
2.6 Biovidrio	20
2.7 Impresión 3D en Ingeniería de Tejidos	22
2.8 Tratamientos superficiales	23
2.9 Replicación de estructuras anatómicas	24
2.10 Legislación y recomendaciones para la impresión 3D en aplicaciones médicas.	25
3. Materiales y Métodos	26
3.1 Materiales	26
3.2 Fabricación de Filamentos - Extrusión	27
3.3 Pesaje	30
3.4 Caracterización Calorimétrica	30
3.5 Fabricación de piezas por impresión 3D para análisis y caracterización	32
3.6 Análisis morfológico	35
3.7 Tratamiento superficial con BG	40

3.8	Propiedades Mecánicas	40
3.9	Actividad en medio biológico simulado	48
3.10	Protocolo programa .DICOM a .STL	49
4.	Resultados	52
4.1	Tratamiento superficial del BG	52
4.2	Filamentos	52
4.3	Pesaje	54
4.4	Análisis Calorimétrico	55
4.5	Piezas Impresas	58
4.6	Análisis Morfológico	61
4.7	Tratamiento superficial con BG sobre impresos 3D	67
4.8	Ensayos mecánicos	67
4.9	Actividad en medio fisiológico simulado	74
4.10	Protocolo software .DICOM a .STL	75
5.	Estudio Normativo	80
6.	Discusión	85
7.	Conclusiones	95
8.	Referencias	97
9.	Anexos	103

Resumen

Las fracturas y enfermedades del tejido óseo son un problema común y que pueden afectar a cualquier persona. Dada su naturaleza, este tipo de tejido es capaz de regenerarse parcial o totalmente. Se han empleado diversos materiales y técnicas para asistir dicha regeneración. Muchas de las alternativas empleadas pueden generar respuestas inmunológicas, causando inflamación y generando mayores inconvenientes que la solución propuesta. En los últimos años, se han realizado numerosas investigaciones basadas en el desarrollo de andamios reabsorbibles, que pretenden evitar los problemas de incompatibilidad entre el producto aplicado y el organismo, y participando activamente en el proceso de regeneración.

Los andamios reabsorbibles son productos médicos compuestos por biomateriales. Son estructuras tridimensionales que cumplen la función de reemplazar temporalmente y/o ayudar en el proceso de restauración de tejidos u órganos vivos y luego son biodegradados. Los mismos pueden obtenerse a través de la técnica de fabricación aditiva, la cual les permite emular la estructura macro y microscópica del tejido a regenerar. La fabricación aditiva es un proceso con el que se construye un objeto tridimensional, aplicando capas bidimensionales de manera secuencial, de modo que cada capa se adhiere a la anterior. Sus aplicaciones en el ámbito médico pasaron de ser una promesa a ser el eje central de numerosas investigaciones y desarrollos.

En este informe, se presenta el estudio y caracterización de la técnica de impresión tridimensional por deposición de filamento fundido, comúnmente conocida como “impresión 3D”, para fabricar andamios orientados a mimetizar características mecánicas y morfológicas del tejido óseo. Éstos están compuestos por un polímero biocompatible, biodegradable y termoprocésable, y el agregado de un vidrio bioactivo osteoconductor y osteoinductor. El estudio realizado demuestra el potencial que tienen dichos andamios para formar una estructura estable, adaptable a la anatomía del paciente y que permita el anclaje en el tejido circundante, lo cual facilitaría la adhesión y proliferación celular, actuando como agente conductor en la regeneración del hueso.

Entre los resultados más relevantes, se demuestra la capacidad de fabricar piezas que respetan fielmente a los diseños computarizados y la capacidad de formar estructuras con poros interconectados y de dimensión manipulable, característica esencial buscada en el producto final. Además, se observa la posibilidad modificar parámetros de impresión para que el comportamiento mecánico de los constructos se asemeje al del tejido óseo esponjoso. Por otra parte, se ha visto la formación de hidroxapatita en la superficie de los andamios, lo cual confirmaría su rol como agentes osteoconductores.

Finalmente, se presenta una extensa caracterización de los procesos productivos, del producto final y de los materiales en las distintas etapas de producción, junto con una evaluación del grado de cumplimiento normativo según leyes y recomendaciones emitidas por organismos nacionales e internacionales.

1 Introducción

En esta sección se indica el contexto en el cual se desarrolló el proyecto. Además, se mencionan los antecedentes, la hipótesis y los objetivos.

1.1 Contexto

El presente proyecto se ubica dentro de una de las líneas de investigación del Laboratorio de Biomecánica, Biomateriales y Bioinstrumentación, Lab3Bio: “Desarrollo de andamios reabsorbibles para regeneración ósea”. En dicha línea se evalúan, desarrollan y caracterizan diferentes técnicas para la fabricación de estructuras tridimensionales con propiedades específicas que los hagan biocompatibles, reabsorbibles y osteoinductores. Además de la realización del presente Proyecto Final, se han presentado trabajos relacionados en los siguientes eventos: Simposio Argentino de Polímeros 2019, CaracterizAR 2020, CellMat 2020.

El Lab3Bio, ubicado en el campus Miguelete de la Universidad Nacional de Gral. San Martín, UNSAM, tiene un doble propósito: incorporar tecnología biomédica a la plataforma de investigación, desarrollo e innovación (I+D+i) y brindar equipamiento y conocimiento de profesionales altamente especializados para interactuar con estudiantes, docentes e investigadores de la Universidad y con quienes requieran asistencia tecnológica.

Además, para la realización de algunos procesos y caracterizaciones, el Laboratorio cuenta con la colaboración de profesionales y organizaciones que se irán mencionando a lo largo del presente escrito.

1.2 Antecedentes

El hueso es un material poroso, compuesto principalmente por una proteína (colágeno) y un mineral inorgánico (hidroxiapatita, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, HA). Éste se halla involucrado en un proceso de remodelación constante, que incluye una etapa de formación y otra de resorción.

Ballester Alfaro explica en su libro [1]:

“Cuando el tejido óseo se lesiona, se pone en marcha un proceso donde intervienen factores moleculares, fisiológicos y biomecánicos, cuyo fin es la formación de un nuevo tejido que posee la mayoría de las características previas a la fractura. (..) Sin embargo, existen situaciones clínicas complejas que pueden superar la capacidad de regeneración del hueso. Nos referimos a

los grandes defectos óseos provocados por fracturas complejas, infecciones, tumores o deformidades esqueléticas. Otras enfermedades que comprometen el proceso regenerativo óseo pueden ser las necrosis avasculares, la pseudoartrosis atróficas, o las osteoporosis graves”.

Con el objetivo de facilitar la recuperación el tejido óseo dañado, históricamente se han utilizado prótesis metálicas o injertos óseos tanto del propio paciente, como de terceros, que tienden a generar rechazos o reacciones adversas, en algunos casos, causando mayores inconvenientes que el problema original. En los últimos años, las investigaciones en ingeniería de tejidos y biomateriales se han orientado a la fabricación de soluciones que estimulen mecanismos naturales del cuerpo humano para la regeneración de los diferentes tejidos. Este paradigma propone asistir al propio cuerpo en el proceso de reconstrucción del tejido dañado, evitando la exposición a componentes extraños.

Las estructuras tridimensionales están compuestas por biomateriales, y diseñadas con la función de ser sostén de las células, buscando promover su adhesión, proliferación, diferenciación y organización; por lo que reciben el nombre de andamios. Estas estructuras pueden estar compuestas por materiales inorgánicos, por materiales poliméricos o por la combinación de ambos. Se implantan en el organismo vivo y permanecen expuestos a la acción de fluidos biológicos hasta su reabsorción y reemplazo por tejido natural.

Los vidrios de silicato bioactivos, comúnmente denominados biovidrios (BG), constituyen un grupo de biomateriales inorgánicos con actividad biológica con perspectivas para su aplicación en ingeniería de tejido óseo. Su éxito se basa en la liberación controlada de iones específicos en el ambiente de acción, los cuales inducen el proceso de formación de tejido y la adhesión al tejido existente. Las primeras aplicaciones fueron como implantes en la cóclea y como sustitutos dentales. El polihidroxi butirato-co-hidroxi valerato (PHBV) es un polímero que deriva de la familia de los polihidroxi alcanoatos. El mismo se obtiene por fermentación bacteriana en un proceso amigable con el ambiente. Al ser biocompatible y biodegradable, resulta atractivo para aplicaciones biomédicas. Sumado a esto, sus propiedades mecánicas y la posibilidad de manipularlo térmicamente lo convierten en material potencial para la fabricación de matrices que sirven como base para el crecimiento de tejido óseo. Actualmente se lo está produciendo por fermentación bacteriana en el Lab3Bio.

Diferentes técnicas de fabricación han permitido obtener estructuras simples y con porosidades variables. Entre ellas, se pueden mencionar el uso de cementos bioactivos a base de polvos, el electrohilado (en inglés, *electrospinning*), el proceso sol-gel, el uso de moldes con agentes porógenos, y las novedosas técnicas de manufactura aditiva, como la impresión 3D. La impresión

3D por deposición de filamento fundido (por sus siglas en inglés, *FDM*) es una técnica versátil que permite replicar estructuras óseas a partir de imágenes 3D de tomografías computarizadas del paciente a tratar, a la vez que permite la producción a pequeña escala con bajo costo.

Si bien las características de los materiales resultan prometedoras y se han realizado numerosas investigaciones con ambos materiales combinados y/o con otros materiales similares, no se han encontrado aún investigaciones o desarrollos que combinen al PHBV con partículas de Biovidrio como materiales de base para fabricación de matrices tridimensionales con el uso de impresoras 3D por deposición de filamento fundido. El uso de esta técnica de fabricación en conjunto con los materiales previamente mencionados, podrían diferenciarse de otros productos similares en su capacidad de ser manipulados en distintas escalas (macro y microscópicas) logrando propiedades mecánicas y morfológicas acordes a su intención de uso.

En este proyecto, se utiliza FDM como técnica de impresión 3D para fabricar andamios compuestos por PHBV y PHBV+BG, que mimetizarían temporalmente el comportamiento mecánico del tejido a la vez que catalizarían la regeneración ósea.

1.3 Hipótesis

Dadas sus características térmicas y mecánicas, se pueden fabricar filamentos flexibles de PHBV por extrusión para ser utilizados como insumo en impresoras 3D de deposición filamento fundido. Del mismo modo, si se combinan los materiales PHBV y BG en el proceso de extrusión, es factible la fabricación de filamento de PHBV con las partículas de BG homogéneamente distribuidas en su interior.

Además, gracias al uso de la técnica de impresión 3D, se pueden fabricar piezas orientadas a cada paciente a partir de imágenes tomográficas. Luego, con los filamentos de PHBV pueden imprimirse piezas biocompatibles, con porosidades regulables y propiedades mecánicas prometedoras para su utilización como andamios para regeneración de tejido óseo.

Es conocida la capacidad de adhesión celular del BG, permitiendo crear lazos fuertes con el hueso. El agregado superficial de BG a las estructuras tridimensionales elaboradas por impresión 3D propende a incrementar la liberación de iones al medio y activar la adhesión y proliferación de las células involucradas en la regeneración ósea desde el momento de implantación, facilitando el anclaje de estas en la zona deseada y activando los mecanismos de regeneración.

1.4 Objetivos

El objetivo general del proyecto es diseñar, fabricar y caracterizar andamios reabsorbibles que emulen temporalmente las características del tejido óseo y estimulen los mecanismos de osificación. Dicho objetivo comprende las etapas de selección de materiales, el diseño de los procesos de fabricación, el uso de la impresión 3D como técnica de fabricación de piezas a medida del paciente y el estudio de las características relevantes de los andamios fabricados.

Los objetivos específicos son:

- 1- Elaborar filamentos compuestos por PHBV y PHBV+BG, que puedan utilizarse en la impresora 3D de FDM.
- 2- Diseñar e imprimir andamios que mimeticen la morfología y el comportamiento mecánico del tejido óseo.
- 3- Caracterizar el material mediante estudios calorimétricos en cada etapa del proceso de producción.
- 4- Ensayar el potencial osteoconductor de los andamios.
- 5- Explorar diferentes herramientas computacionales para convertir imágenes tomográficas en objetos 3D.
- 6- Realizar un estudio normativo para caracterizar los materiales, la fabricación y el producto final con vistas a dar cumplimiento a legislaciones y/o recomendaciones vigentes nacionales e internacionales.

2. Fundamentos

En esta sección se presenta el marco teórico y se describe la fundamentación del uso de las diferentes técnicas aplicadas. Se explican las propiedades del hueso relevantes para el presente proyecto y se demuestra por qué la impresión de piezas tridimensionales, con la técnica de deposición de filamento fundido fabricado con un polímero y biovidrio determinados, puede ser un buen camino para dar solución a problemas como traumas o enfermedades del tejido óseo.

2.1 Biomateriales

La investigación en ciencia de materiales en el ámbito médico, junto con los avances tecnológicos, fueron modificando la concepción de los “biomateriales” y lo que esta palabra representa. Hoy en día se los clasifica en diferentes generaciones de biomateriales.

Los de *primera generación* eran seleccionados para ser implantados en un sistema viviente, intentando ser sistemática y farmacológicamente inertes. Esta definición plantea la idea de no interacción con el tejido, gracias a la utilización de materiales que generen la menor respuesta inmunológica posible. A modo de ejemplo, puede citarse el uso de prótesis metálicas para dar soporte mecánico, favoreciendo la regeneración ósea tras una fractura [2].

Tras los avances tecnológicos y descubrimientos de nuevos materiales o la utilización de otro tipo de materiales en este ámbito, surgieron los biomateriales de *segunda generación*: aquellos materiales no vivientes, utilizados en un dispositivo médico destinado a interactuar con los sistemas biológicos [3], [4]. Esta idea cambió totalmente el concepto de los biomateriales, dado que su función esencial pasó a ser la de intentar generar una reacción dentro del cuerpo, ya sea por ser bioactivo o por ser reabsorbible dentro del cuerpo. Por ejemplo, el uso de vidrios bioactivos incrementa la capacidad de formación de capas de hidroxiapatita que luego permiten la proliferación y diferenciación de células óseas [3]. Continuando, son de común utilización los cementos a base de fosfato cálcico e hidroxiapatita, pero su capacidad como soporte estructural es limitada. Se han patentado compuestos de colágeno junto con cerámicos como soluciones para ayudar a la regeneración del hueso. También, se ha visto el uso de hidroxiapatita en tratamientos superficiales de implantes metálicos para mejorar la fijación, entre otras aplicaciones [1], [3], [5].

Los biomateriales de *tercera generación* son aquellos diseñados para estimular respuestas celulares específicas a nivel molecular. Lo que se busca es generar la activación de genes que estimulen la regeneración del tejido vivo [3]. Se habla de una convergencia del componente

bioactivo y el componente reabsorbible de los materiales, incluyendo la implantación de células y/o factores de crecimiento en matrices inorgánicas. Esto es logrado con el uso de biomateriales compuestos para lograr la adhesión, proliferación y diferenciación celular que da origen al nuevo tejido y, además, la posterior degradación de la estructura creada para tal fin.

La aplicación final buscada para las estructuras diseñadas en el presente proyecto las ubicaría dentro de los biomateriales de 3° generación, dado que están orientadas a generar respuestas específicas a nivel molecular estimulando procesos de osificación, para luego degradarse dentro del cuerpo, sin generar consecuencias que impliquen un peligro para la salud del paciente.

Cabe destacar que, si bien no se tratará ese tema en este proyecto, se está hablando actualmente de una *cuarta generación* de biomateriales, en la que se busca la comunicación con el tejido manipulando señales bioeléctricas que estimulen la regeneración y permitan el seguimiento de la respuesta celular [4].

2.2 Ingeniería de Tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo en el cual el conocimiento en la vida científica y médica se aplica usando principios ingenieriles con el objetivo de diseñar tratamientos terapéuticos que afecten positivamente la función del tejido [6]. Esta rama de la ingeniería puede subdividirse en diferentes estrategias, que van desde cultivo y trasplante celular, fabricación de andamios, combinación de éstos con factores de crecimiento, etc. En definitiva, los equipos de investigación tienen múltiples opciones, tanto conceptuales como tecnológicas, para abordar una estrategia y desarrollarla [7].

Lo que se busca en este proyecto es coordinar diferentes disciplinas (química, medicina, ingeniería, diseño, etc.) para fabricar una estructura tridimensional constituida por un componente de base que mimetiza las características mecánicas del tejido óseo, y un componente bioactivo que estimula la regeneración de la matriz ósea.

2.3 Tejido Óseo

El hueso es un tipo de tejido conectivo. Es rígido, poroso, de color blanquecino, sirve para dar estructura, protección y actúa como la parte pasiva del aparato locomotor [8].

2.3.1 Composición

El tejido óseo se compone de matriz extracelular y células óseas. La matriz extracelular tiene una porción orgánica y otra inorgánica. La porción orgánica es sintetizada por las células óseas y representa el 35 % de la matriz extracelular, está formada principalmente de colágeno y en menor medida de otras proteínas. La porción inorgánica representa el 65 % restante de la matriz y está formada por agua, iones y depósitos de hidroxapatita, HA. La HA es un material inorgánico y cristalino, compuesto de calcio, fosfato y carbonato. También hay presencia de fluoruros, magnesio, potasio y sodio. Al colágeno se le atribuyen las propiedades de viscoelasticidad y de resistencia. A la fase mineral se le atribuye la característica de rigidez, por el alto contenido de sustancias minerales complejas [7].

Las células del tejido óseo se dividen en: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteoclastos, osteocitos [9]:

- *Osteoprogenitoras*: Son células que tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse en osteoblastos. Se encuentran activas en etapas de formación y crecimiento de hueso, y se reactivan durante la vida adulta ante la necesidad de reparación de fracturas y otras formas de lesión de hueso.
- *Osteoblastos*: Son células grandes (20 a 30 μm), derivan de las células osteoprogenitoras. Los osteoblastos sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y sintetizan factores de crecimiento. Su vida media es de 1 a 10 semanas, luego pueden desaparecer por mecanismo de apoptosis (muerte celular programada), transformarse en células de revestimiento o en osteocitos.
- *Osteocitos*: Son las células más abundantes del hueso maduro y derivan de los osteoblastos que, al quedar rodeados de la matriz que sintetizan, se diferencian en osteocitos. Los osteocitos residen en lagunas situadas en el interior de la matriz ósea calcificada y se organizan formando un sincitio de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse oxígeno y nutrientes. Su función es mantener la matriz extracelular ósea mediante la síntesis y mineralización de la matriz, pero fundamentalmente se cree que es el principal controlador del remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas. Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse.

- **Osteoclastos:** Son los macrófagos del hueso, se producen por fusión de células madre procedentes de la médula ósea. Son células de gran dimensión (100 μm). Su función es la renovación y remodelación ósea mediante un proceso de resorción. Este proceso se caracteriza por eliminación de matriz ósea en múltiples puntos para ser sustituida por hueso neoformado.

2.3.2 Tipos de hueso

Al tejido óseo se lo divide en dos variedades: hueso compacto o cortical y hueso esponjoso o trabecular. En la Figura 1 se observa la estructura de ambas variedades.

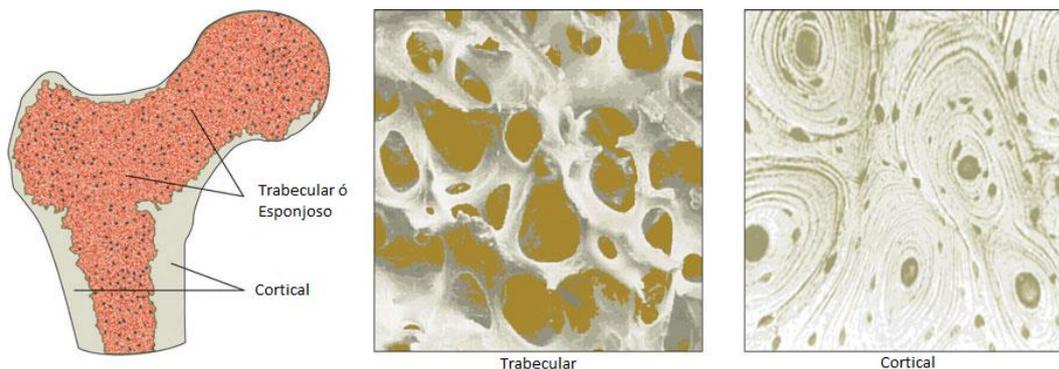


Figura 1 Imagen de hueso esponjoso o trabecular, y compacto o cortical, adaptada de [10].

El hueso compacto es formado por laminillas óseas, que son porciones de matriz ósea inmediatamente aplicadas unas contra otras sin cavidades intermedias, las mismas se disponen de manera radial alrededor de los vasos sanguíneos. A cada conjunto de laminillas se lo denomina osteona. Luego, hay lagunas que están ocupadas por osteocitos que se encuentran interconectadas por canales diminutos, esenciales para la nutrición e intercomunicación de las células óseas.

El tejido esponjoso es formado por trabéculas, que son laminillas dispuestas en diferentes orientaciones que entran en contacto en algunos puntos, por lo que forman una matriz porosa entre la cual se acumula médula ósea. Los osteocitos se asocian en lagunas intercomunicadas irregularmente y no son penetrados por vasos sanguíneos, sino que están rodeados por los espacios medulares que están vascularizados. Este tipo de organización se asemeja a la estructura de una esponja, de allí su nombre.

2.3.3 Estructura

A continuación, se muestra la Figura 2, que representa la escala dimensional de las distintas estructuras formadoras del tejido óseo. Se observa la distribución macroscópica, los patrones

que forman las fibras de colágeno a distintos niveles y la localización de los minerales dentro del tejido [11].

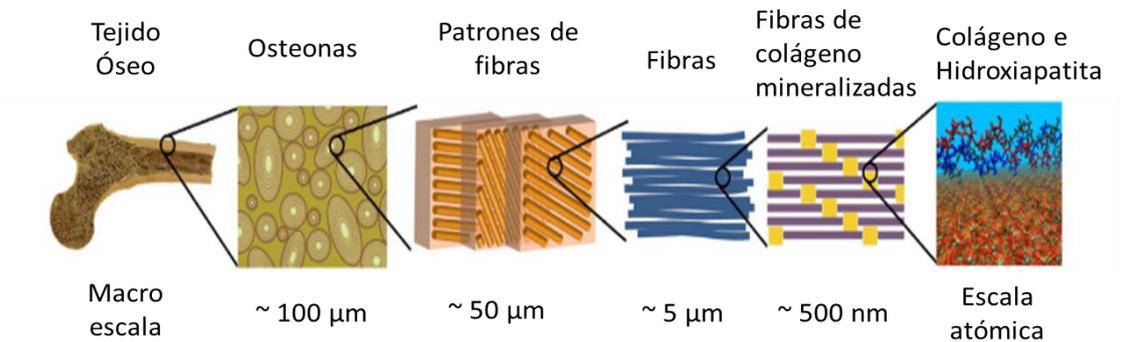


Figura 2 Estructura jerárquica del tejido óseo. Adaptado de [11].

Estas estructuras se caracterizan por la presencia de poros distribuidos jerárquicamente. Se generan canales interconectados de 90 a 150 µm de diámetro, necesarios para intercambio de nutrientes y desechos, y canales de 300 a 800 µm de diámetro, necesarios para dar lugar a vascularización. Diámetros de 100 µm equivalen a áreas transversales de 0,01 mm² y diámetros de 500 µm equivalen a áreas transversales de 0,25 mm².

2.3.4 Comportamiento Mecánico

La estructura íntima del hueso compacto y el hueso esponjoso, como muestra la histología, es en todos los casos la misma. La diferencia radica en un cambio en la disposición estructural de la sustancia ósea. Como consecuencia de esto, el tejido presenta densidades y propiedades mecánicas diferentes. En la Tabla 1 se presentan algunos resultados de ensayos realizados en las dos variedades que presenta el tejido.

Tabla 1 Propiedades mecánicas del tejido óseo. Adaptado de [7]

Propiedad	Hueso Compacto	Hueso Esponjoso
<i>Tensión máxima de compresión (MPa)</i>	100 - 230	2 - 12
<i>Módulo tensil, tracción (GPa)</i>	7-30	0,05 - 0,5
<i>Tensión máxima, flexión (MPa)</i>	50 - 150	10 - 20
<i>Deformación a la rotura, tracción (%)</i>	1 - 3	5 - 7
<i>Tenacidad a la fractura (MPa . m ½)</i>	2-12	Sin datos*...

Los resultados presentados en la tabla, en conjunto con ensayos de otros autores, servirán como punto de comparación con el andamio que se pretende fabricar en el presente proyecto. En bibliografía se observaron estudios de una amplia variedad de huesos, y en diversas condiciones, por lo tanto, los resultados reportados presentan un extenso espectro de valores [12]. Dada esta variabilidad en el comportamiento mecánico, es altamente improbable lograr una estructura universal que pueda dar solución a todo tipo de hueso.

Desarrollo y crecimiento del hueso

El hueso es un tejido dinámico en constante reabsorción, que permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfocálcico. La composición, la disposición estructural y el comportamiento mecánico son factores determinantes para el correcto funcionamiento de este proceso.

El hueso crece por aposición, es decir, por el depósito de sales minerales en la superficie del tejido conectivo. El proceso de remodelado óseo puede ser resumido en las fases presentadas en la Figura 3 [9]:

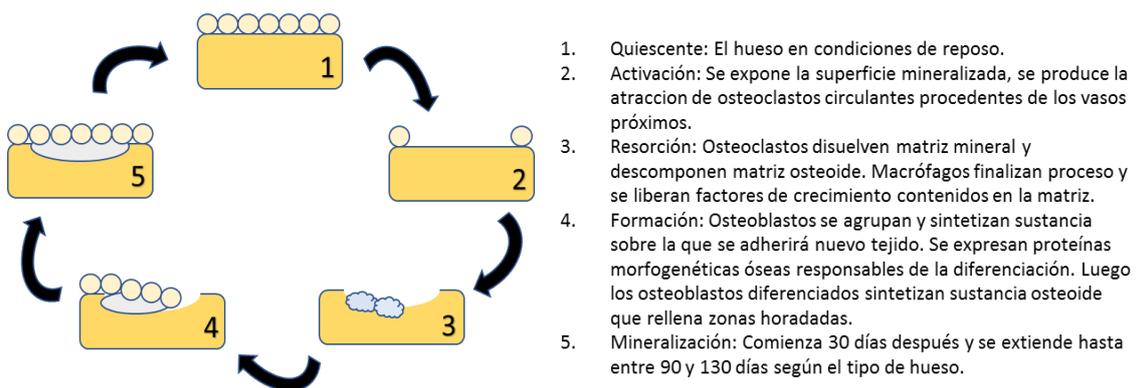


Figura 3 Esquema del proceso de regeneración ósea.

2.4 Andamios

A la hora de tratar con fracturas y enfermedades del tejido óseo, se han utilizado diversos materiales que pueden ser rechazados o generar respuestas inmunológicas adversas. Los materiales metálicos son los más usados actualmente gracias a sus elevadas propiedades mecánicas y su estabilidad in vivo. Sin embargo, pueden presentar inconvenientes de toxicidad a largo plazo o producir el fenómeno conocido como apantallamiento de tensiones. Este fenómeno es causado por la gran diferencia de módulo elástico entre el metal y el tejido óseo, ocasionando pérdida de masa ósea, debilitando al hueso e incrementando el riesgo de fractura de éste o incluso del implante, lo que implicaría un mayor riesgo para el paciente y costo extra

por la necesidad de una segunda intervención [13]. Existen otras técnicas que pretenden lograr la regeneración de tejido con variados resultados. Los autoinjertos requieren procesos quirúrgicos en dos sitios del paciente, lo que aumenta la tasa de complicaciones por infecciones, puede inducir morbilidad en la zona dadora, y su utilización puede ser limitada por dificultades técnicas y/o cantidades disponibles para su extracción [1]. Los aloinjertos presentan riesgos de transmisión de enfermedades y rechazo por parte del receptor [6], [14].

La solución a dichos problemas podría surgir de nuevas técnicas que permitan mejor aceptación de agentes externos en el organismo. Actualmente se pretende que el tejido reconozca a los agentes externos utilizados como propios, de modo que su mecanismo de regeneración natural se presente facilitado e incluso favorecido por éstos. El uso de andamios (en inglés, *scaffolds*) diseñados a medida y compuestos por biomateriales pareciera ser la respuesta.

Un andamio es una estructura tridimensional que funciona como matriz temporaria, tiene una arquitectura determinada y está compuesta por materiales específicos que permiten la colonización, migración, crecimiento y diferenciación de las células que guían a la regeneración del tejido objetivo para el cual fue ideado [7], [15].

Existen diversas técnicas para fabricar andamios, las más tradicionales son aquellas que forman un bloque de material en un molde con agentes porógenos, como la lixiviación de sales, formación de gases, separación de fases y liofilización. Actualmente, las técnicas de manufactura aditiva (ver sección [2.7](#)) están tomando mayor protagonismo, dado su bajo costo y su mayor capacidad de diseño de estructuras a escala macro y micro [16].

Hay 2 conceptos asociados a la capacidad regenerativa de cualquier producto empleado como sustituto óseo temporal: *Osteoconducción* y *osteoinducción*. La *osteconducción* refiere a poseer una superficie sobre la cual se permita el crecimiento del hueso. De esta manera, puede guiarse la regeneración. La *osteoinducción* refiere a la capacidad de estimular células no diferenciadas para su desarrollo como células formadoras de tejido óseo, proceso que precede a la generación de nuevo tejido [17], [18].

El andamio ideal debería imitar la composición y las características mecánicas del hueso, esto es [15], [19]:

- Porosidades que repliquen la estructura jerárquica del tejido óseo, ver sección 2.3.3. Los canales más pequeños facilitan la adhesión de los osteoblastos, dado que estos comienzan a anclarse en los andamios formando pequeños grupos de células. Los canales más grandes dan lugar a la comunicación vascular y nerviosa que se debe formar una vez que el hueso comienza a regenerarse.

- Superficies que promuevan la adhesión, proliferación y diferenciación celular, por su morfología y por su composición (rugosidad, hidrofiliidad, presencia de hidroxiapatita).
- Material que presente una tasa de degradación en el cuerpo humano que coincida con la tasa de formación de tejido estructural.
- Tanto el material como los productos de su descomposición deben ser biocompatibles, no citotóxicos y debe observarse estabilidad en condiciones de inflamación.
- Propiedades mecánicas que emulen las del tejido óseo.
- Dimensiones a medida del paciente, es decir, que replique la forma macroscópica del tejido a reemplazar o se adapte a los puntos anatómicos de referencia.

2.5 PHBV

El PHBV es un copolímero de poli 3-hidroxi butirato (HB) y 3-hidroxi valerato (HV), que proviene de la familia de los polihidroxi alcanoatos. Son poliésteres termoprosesables, biodegradables, biocompatibles y pueden ser producidos por diferentes microorganismos [20]. En la Figura 4 se observa la estructura molecular del PHBV.

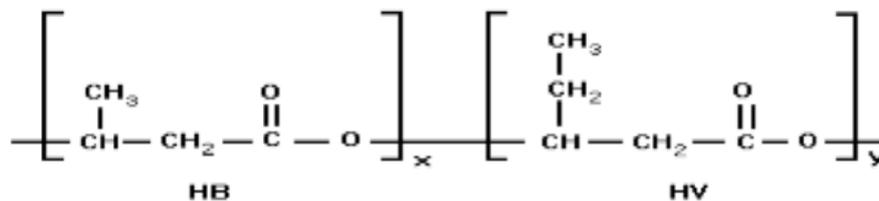


Figura 4: Estructura molecular del PHBV [13]

Las cadenas poliméricas del PHBV se distribuyen en forma desordenada en algunas regiones del material (fase amorfa) pero mayoritariamente se pliegan dando lugar a una estructura ordenada denominada lamela (fase cristalina). Las lamelas nuclean y constituyen estructuras esféricas denominadas esferulitas. Su temperatura de transición vítrea es de -5 °C a -2 °C, su temperatura de fusión es 169 °C y su temperatura de cristalización es de 80 °C a 110 °C, todas dependientes de la proporción presente de valerato [21], [22], [23].

El PHBV posee propiedades piezoeléctricas al igual que el hueso y es un polímero fácilmente procesable. Su tasa de degradación es suficientemente lenta, compatible con el proceso de regeneración ósea y puede ser regulada, por ejemplo, por su forma, tamaño o modificando el porcentaje de valerato [20], [24]. Se observaron pérdidas de 30 % de masa en espumas de PHBV

tras 180 días de sumersión en un medio biológico simulado [20]. Un estudio demostró entre un 15 % y 42 % de pérdida de peso molecular en sustitutos óseos de PHBV en ratones tras 6 meses de implantación [25]. Estudios de láminas de PHBV muestran procesos lentos de degradación en agua a 30 °C y 40 °C , llegando a un 30 % de pérdida de masa tras 200 días [26], por otro lado, se ha trabajado con compuestos de biovidrio y PHBV que llegan a perder entre un 8 % y 30 % de masa tras 9 semanas de incubación en solución buffer a 37 °C [27]. Se han visto en bibliografía filamentos para impresoras 3D elaborados con polihidroxialcanoatos combinado con otros materiales: Policaprolactona (PCL), Sulfato de Calcio (CaSH), Acido Poliláctico (PLA) [13], [28], [29]. Además, compuestos de 30 % PHBV (con 8 % de valerato) + 70 % Hidroxiapatita han logrado soportar tensiones de compresión del mismo orden de magnitud que algunos huesos humanos, 62 MPa [30].

Sus propiedades y amplia disponibilidad hacen que sea un material promisorio en todo lo relativo a investigación en la industria de la salud. Si bien tiene muchos usos posibles, tales como liberación controlada de medicamentos, o creación de matrices de cultivo, este proyecto se centra en sus aplicaciones como andamios para tejido óseo. Muchos de estos autores han confirmado proliferación celular en sistemas con PHBV *in vitro* e *in vivo*, un ejemplo de esto es la utilización de matrices de PHBV para reparar defectos de cartílagos en conejos, donde se evaluó la formación de tejido cartilaginoso articular *in vivo* usando condrocitos sembrados en matrices de PHBV, con reacciones inmunológicas mínimas en 8 y 20 semanas [20], [31].

Por otro lado, el PHBV es un polímero hidrofóbico, característica que disminuye su capacidad para adherir células y también dificulta su unión al BG, dado que este último es hidrofílico. Para el buen desempeño de los andamios, sería importante encontrar plastificantes o tratamientos superficiales que logren mejorar la adhesión celular.

2.6 Biovidrio

Tras la guerra de Vietnam, un coronel de la armada estadounidense planteó la idea de utilizar un material que soporte las condiciones hostiles que presenta el cuerpo humano, para poder utilizarlo en lugar de las prótesis usadas hasta el momento con los heridos en combate, dado que éstos presentaban un alto índice de rechazo. Ante esto, Larry Hench esbozó la siguiente teoría [2]:

“El cuerpo humano rechaza los metales y polímeros formando cicatrices, dado que los tejidos vivos no están compuestos por dichos materiales. El hueso contiene un componente de fosfato

de calcio hidratado, hidroxiapatita, y por eso si un material es capaz de formar una capa de hidroxiapatita in vivo, podría no ser rechazado por el cuerpo.”

Bajo esta idea, desarrolló en 1969 un biovidrio denominado Bioglass®. El mismo es un biomaterial de 3° generación y está diseñado para activar genes que estimulan la regeneración del tejido vivo. Es un cerámico y su composición más utilizada está dada por: 24,5 % Na₂O, 24,5 % CaO, 45 % SiO₂, 6 % P₂O y se lo conoce como Bioglass 45S5 [2].

La virtud más relevante del biovidrio es su capacidad de generar lazos muy fuertes con el hueso. Esto se da gracias a que el material produce una rápida liberación de iones solubles en el medio, principalmente compuestos de calcio y silicio, que en medio fisiológico dan lugar a la formación de una gran superficie de hidroxiapatita, y facilita la absorción de factores de crecimiento, lo cual prosigue con la adhesión, proliferación y diferenciación de las células óseas, culminando con la mineralización de la matriz.

En la revisión de Hench se menciona que han realizado evaluaciones de fuerzas de corte interfacial entre uniones óseas a BG en ensayos con monos y ratas. La resistencia registrada en las uniones entre el hueso y el BG ha resultado igual o incluso más fuerte que el propio hueso. Allí se explica que la formación de una capa de HA en la superficie del andamio es útil, pero no es el eslabón crítico en la cadena de reacciones para la regeneración ósea. La clave recae en controlar la liberación de iones en el ambiente de acción, para facilitar la proliferación y diferenciación celular. Es allí donde el biovidrio se destaca.

Existe un estudio en el que se muestran los efectos de la disolución de productos iónicos derivados del biovidrio en un medio con presencia de ADN y osteoblastos humanos, analizando la expresión genética tras 48 horas de inmersión. Los resultados de este experimento mostraron que, de 1176 genes evaluados, 196 genes comúnmente expresados en osteoblastos humanos incrementaron los valores de base. Este estudio indica que los vidrios bioactivos catalizan la osteogénesis mediante el control de genes que regulan el ciclo celular [32], [18].

Otros trabajos permiten observar el efecto que genera el agregado de BG a matrices hechas de PHBV, tal como se ilustra en la Figura 5. Se produce el aumento de las propiedades mecánicas en compresión, mejora la absorción de agua, disminuye el ángulo de contacto (parámetro relacionado con la hidrofiliidad) y provoca un aumento en la adhesión celular [31], [32].

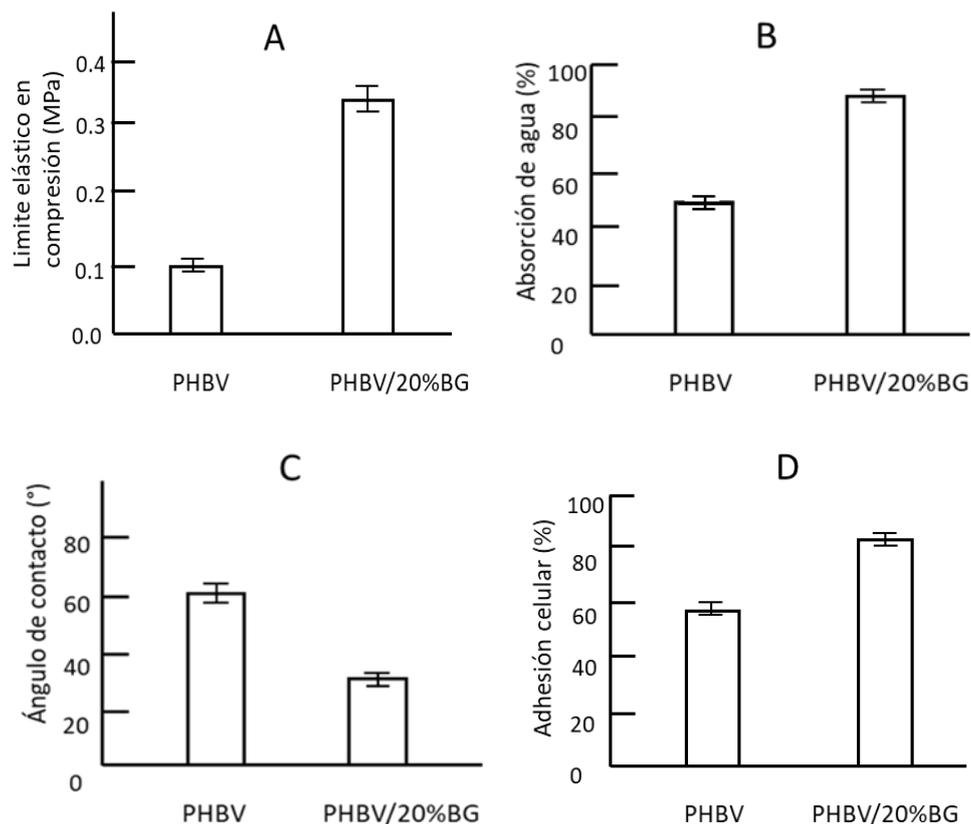


Figura 5: Comparación de propiedades de andamios de PHBV y PHBV+BG(20%): (A) Aumento de Resistencia a la compresión, (B) Aumento de la absorción de agua, (C) Disminución del ángulo de contacto, (D) Aumento de porcentaje de adhesión celular [31].

2.7 Impresión 3D en Ingeniería de Tejidos

La manufactura aditiva, MA, es un proceso de fabricación de objetos mediante la adición de capas unas sobre otras. Existen muchas técnicas de fabricación, algunas de ellas son: deposición de material o filamento fundido, sinterización selectiva por láser, estereolitografía, inyección de aglutinantes, etc.

La versatilidad y capacidad de diseño que brindan estas tecnologías acrecentó el número de investigaciones en el ámbito de la salud [33]. Muchos autores destacan otras ventajas del uso de estas tecnologías: tienen el potencial de incrementar la productividad, la eficiencia y reducir costos, sobre todo cuando se trata de piezas orientadas a solucionar el problema de cada paciente en particular, a la vez que permite la democratización del diseño y manufactura de bienes [34].

El sistema de MA por deposición de material fundido funciona del siguiente modo: Un filamento de sección circular de un determinado material es empujado por un extrusor, fundido por un sistema de calentamiento usualmente llamado “hot end” y depositado a través de un pico en

una base o cama de impresión. Instantáneamente el material se solidifica en el lugar depositado por enfriamiento. El sistema imprime una primera capa moviéndose en el plano x-y, luego el pico de deposición de material se aleja de la base en el eje z para crear otra capa sobre la primera. Así continúa de manera consecutiva, creando una estructura tridimensional. La Figura 6 muestra un esquema simplificado de un equipo de impresión 3D por deposición de material fundido.

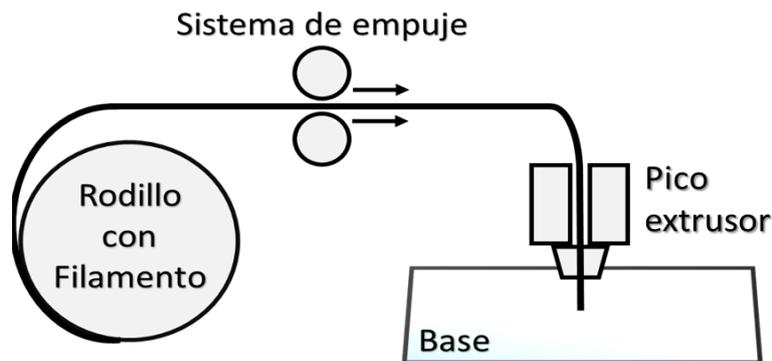


Figura 6: Esquema básico de una impresora 3D por deposición de material fundido.

Las temperaturas utilizadas para imprimir con Acrilonitrilo-Butadieno-estireno, ABS, que puede ser considerado el plástico más común de uso doméstico, se encuentran comprendidas entre 220° C y 240 °C. El PHBV presenta temperaturas de fusión de 160 a 180°C, según la proporción de valerato, lo cual posibilita su manipulación con impresoras basadas en sistemas comerciales de FDM [22]. Sin embargo, el desafío más grande al utilizar materiales no convencionales es la fabricación de un filamento de un diámetro específico y constante, que resulte viable para la utilización en impresoras 3D.

Con el uso de esta técnica puede lograrse la porosidad necesaria para facilitar tanto la migración, adhesión y proliferación celular, como la formación de canales de comunicación para nutrición y vascularización. Mediante la manipulación de ciertos parámetros de impresión tales como: altura de capa, ancho de extrusión, trama de relleno, porcentaje de relleno, entre otros, se pueden lograr poros y canales realmente pequeños, del orden de las decenas de micrones [35].

Para finalizar, cabe destacar que el proceso para imprimir cualquier pieza de plástico comercial para uso recreativo es muy diferente al que debe llevarse a cabo para generar andamios para aplicaciones médicas. Tal como recomiendan los organismos internacionales de control de dispositivos médicos, se debe crear un protocolo para el correcto trato y procesamiento de la información de los pacientes, sumado al importantísimo requerimiento de calidad y al poder de réplica de las estructuras anatómicas [36].

2.8 Tratamientos superficiales

Con la ayuda de tratamientos superficiales se pueden mejorar las posibilidades de adhesión y proliferación celular en los andamios; las técnicas que pueden emplearse son muy variadas.

En primer lugar, se busca el aumento de la superficie de contacto con el medio, esto se puede lograr con la creación de matrices porosas o rugosas. También, se puede modificar la estructura de la superficie aumentando su hidrofiliidad, lo que permite mejorar la adhesión celular. Se han realizado tratamientos superficiales para mejorar la hidrofiliidad de andamios hechos con PHBV. Algunos autores intentaron hacerlo por plasma con diferentes gases [21], otros realizaron técnicas de “leaching”, en las que se agregan sales al polímero como agentes porógenos que luego son extraídas por un solvente adecuado [6]. En otros casos, el agregado de diferentes compuestos cerámicos como hidroxiapatita o biovidrio ha logrado mejorar tanto la hidrofiliidad, como la rugosidad y el comportamiento osteoprogenitor de los andamios [4], [7], [31].

2.9 Replicación de estructuras anatómicas

La tomografía computada permite distinguir los tejidos debido a la diferencia con la cual éstos absorben los rayos X, fenómeno que se ve reflejado en una imagen plana en escala de grises. Gracias a la conjunción de cientos de imágenes tomadas en todas las direcciones y en una sección determinada, se pueden obtener representaciones de alta calidad de la anatomía del paciente en las 3 dimensiones.

Las herramientas de diseño y procesamiento de imágenes digitalizadas pueden aprovechar la información provista por las tomografías para replicar las estructuras anatómicas, formando estructuras digitales tridimensionales. Por último, si se conjugan dichas estructuras digitales con la técnica de impresión 3D, se posibilitan la replicación de las estructuras anatómicas y los diseños específicos aplicables a cada paciente, definidos como “patient matched devices” según el ente regulador de alimentos y medicamentos estadounidense (en inglés, *Food & Drug Administration, FDA*) [33], [34].

La resolución de las tomografías depende de diversos factores que no serán explicados en el presente trabajo. Lo cierto es que más allá de las diferentes tecnologías que puedan utilizarse, las imágenes tomográficas obtenidas deben superar la resolución espacial de la impresora 3D a

utilizar, de modo que los errores sean minimizados y controlados solamente en el proceso de impresión.

2.10 Legislación y recomendaciones para la impresión 3D en aplicaciones médicas.

Los entes reguladores internacionales están comenzando a esbozar documentos para regular este tipo de prácticas. Recientemente, la FDA publicó una guía de consideraciones técnicas para la manufactura aditiva de productos médicos [36]. Por otra parte, puede tenerse en cuenta la normativa europea 2017/745. En Argentina, la ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) presentó una discusión pública con consideraciones técnicas para productos de manufactura aditiva, realizado con ayuda de profesionales de la industria y tomando como referencia el documento publicado por la FDA [37].

Como todo producto médico, el andamio debe ser clasificado como tal, dando cumplimiento a toda la legislación vigente. Los productos médicos son fabricados por una empresa habilitada, que cumple con las buenas prácticas de fabricación para su finalidad establecida, de manera tal que se garanticen la seguridad, la reproducibilidad y un estándar de calidad del proceso de producción, lo que incluye el diseño, los materiales y los procesos de manufactura. Para definir los procesos de fabricación, es esencial formular de antemano los requisitos y la intención de uso del producto, realizar un análisis de riesgo, del cual derivan las especificaciones y los puntos críticos de control del proceso [38], [39], [40].

Por lo pronto, si bien hay cuestiones que aún están en discusión, y está fuera del alcance del presente proyecto fabricar un andamio para una aplicación clínica real, muchas de las recomendaciones citadas pueden abarcadas, y la intención de este trabajo es definir y demostrar el cumplimiento de aquellos aspectos que deberían ser tenidos en cuenta para lograr un producto final.

3. Materiales y Métodos

En esta sección se presentan los materiales y métodos utilizados para fabricar y/o caracterizar los materiales, filamentos y piezas impresas. Se utilizaron PHBV y BG para fabricación de filamentos con el uso de una mini extrusora. Estos filamentos fueron utilizados para imprimir piezas con la impresora 3D. Dichas piezas fueron diseñadas con herramientas digitales, y una vez impresas, se caracterizaron las propiedades morfológicas, mecánicas, calorimétricas, superficiales y su actividad en medio fisiológico simulado.

3.1 Materiales

3.1.1 PHBV

Se trabajó con PHBV de la marca Tiannan, proveniente de China. El material se encuentra disponible en el Lab3Bio en forma de polvo y posee 1,5 % mol de valerato. El mismo fue utilizado sin procesamientos previos.

3.1.2 Biovidrio

Se utilizó biovidrio de composición 45S5 (en adelante BG) en forma de cristales de aproximadamente 5 μm de diámetro, donado por el Dr. Aldo Boccacini de la Universidad Nürenberg-Erlagen-Alemania en el marco del proyecto de colaboración BAYLAT-MINCYT “Desarrollo de sustratos 3D reabsorbibles para regeneración ósea”.

3.1.2.1 Tratamiento del Biovidrio – Silanizado

El BG es hidrofílico y el PHBV es hidrofóbico, esto hace que la interacción entre ambos materiales sea muy pobre. Para mejorar la adhesión entre ellos, se utilizó la técnica de silanizado [41]. Esta técnica consiste en recubrir al BG con grupos silanos a través de métodos químicos, disminuyendo su hidrofiliidad, de manera tal que se mejore la interacción con el PHBV. La Figura 7 esquematiza el proceso de silanización de una partícula de BG.

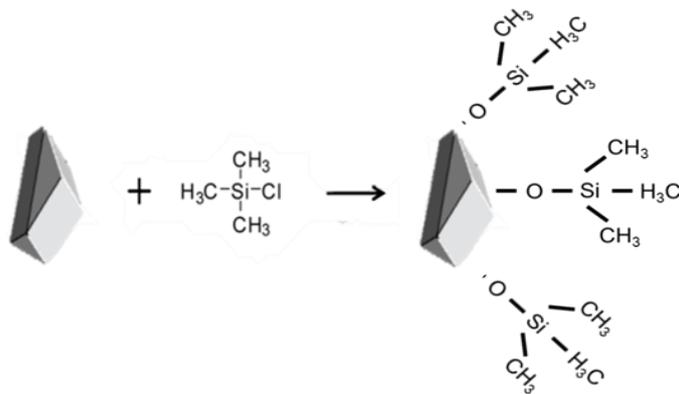


Figura 7 Esquema del proceso de silanización de BG.

Procedimiento para el tratamiento superficial de BG

1. Se sumerge 0,1 g de BG en 1,5 ml de una solución de clorotrimetilsilano (CTMS, Sigma-Aldrich) mezclado al 10 % m/m con tolueno. El objetivo de esto es recubrir la totalidad de los cristales de BG con el clorotrimetilsilano. Dichos cristales se asumen como esferas de 5 μm de diámetro y se usa la cantidad de solución necesaria para superar en 10 veces la superficie total a recubrir, de modo que el agente químico se halle en exceso.
2. Luego, se deja evaporar el solvente con el exceso bajo campana, a temperatura ambiente. Se forma como parte de la reacción ácido clorhídrico, que también se evapora.
3. Finalmente, se deja secar el BG tratado con CTMS en una estufa a 30°C durante 24 horas.

El BG está compuesto de Na_2O , si se tiene en cuenta el cloro aportado por el clorotrimetilsilano, existe la posibilidad de formación de cristales de NaCl [42], [43].

3.2 Fabricación de Filamentos - Extrusión

La impresora 3D que posee el Lab3Bio es de producción nacional marca Codex 2020. Ésta admite filamentos de 1,7 mm \pm 0,2 mm de diámetro. Para poder imprimir andamio de PHBV+BG, es necesario fabricar un rollo de filamento de esta composición.

Se fabricaron dos tipos de rollos de filamento: uno compuesto de PHBV y otro compuesto de PHBV con agregado de BG (4 % m/m). Este último será mencionado de aquí en adelante como "PHBV+BG(4%)". Para permitir la fabricación del filamento, el BG fue previamente tratado con

CTMS, proceso que se explicó en el parágrafo anterior. La mezcla de los polvos se homogeneizó con un mezclador mecánico.

Para fabricar los dos tipos de filamento se usó una extrusora de doble tornillo Thermo Fisher Scientific Process 11. El equipo pertenece a la Fundación Argentina de Nanotecnología (FAN), ubicada en el campus Miguelete de la UNSAM. En la Figura 8 se observa al equipo donde el brazo superior es un tubo de succión para evitar la dispersión de polvos hacia los operarios.



Figura 8 Extrusora de doble tornillo

En la Figura 9 se observa el proceso de extrusión junto con el sistema de enrollamiento del filamento. El filamento se enfría en el ambiente a 24 °C y se enrolla con un equipo que permite regular la velocidad en revoluciones por minuto.



Figura 9 Sistema enrolamiento

<https://www.fan.org.ar/portfolios/extrusora-de-doble-tornillo-thermo-fisher-scientific-process-11/>

La extrusora puede plastificar, moler y transportar los materiales con su sistema de dos tornillos co-rotantes en temperaturas controladas. De este modo, al atravesar el pico de salida (circular y de diámetro modificable) se extrude y moldea el filamento en aire ambiente. En la Figura 10 se puede ver un esquema representativo de dicho funcionamiento.

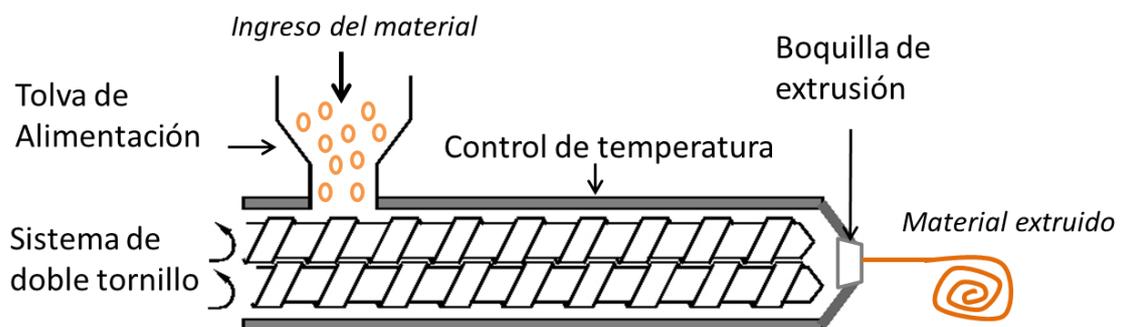


Figura 10: Esquema representativo del funcionamiento del sistema de extrusión de filamento.

Los parámetros que se configuraron para fabricar el filamento fueron:

- Perfil de temperaturas (se puede modificar la temperatura de manera sectorizada en 10 partes que van desde la tolva de alimentación hasta la boquilla de extrusión)
- Velocidad de rotación de los tornillos (en rpm)
- Frecuencia y cantidad de alimentación de material
- Distancia desde a la boquilla de extrusión hasta el sistema de enrollamiento

- Velocidad del equipo de enrollamiento (en rpm)
- Temperatura ambiente en 24 °C (aire)

3.3 Pesaje

Se pesaron retazos de filamento y cubos impresos de 1cm³ para determinar la cantidad de material utilizado. El volumen elegido para este análisis es simplemente un valor de referencia, dado que las piezas fabricadas pueden ser de diferentes tamaños y formas. Para el pesaje se utilizó una balanza ACCULAB ALC-210.4. Se recortaron 5 trozos de 30cm de filamento y se pesaron cubos impresos con 50 % de relleno.

3.4 Caracterización Calorimétrica

3.4.1 Termogravimetría - TGA

La termogravimetría (en inglés, *Thermo-Gravimetric Analysis, TGA*) expresa cambios de masa de una muestra a medida que se aumenta la temperatura. La masa del material se mide con una balanza de precisión, a la vez que la temperatura se incrementa de manera controlada durante un lapso programable. Los resultados se expresan gráficamente a través de termogramas, permitiendo observar la descomposición del material en función de la temperatura.

Se realizó un análisis termogravimétrico del PHBV con la colaboración de la Lic. Nayla Lores en un equipo Shimadzu TGA-50, perteneciente a la Universidad Nacional de Mar del Plata, con el objetivo de evaluar la temperatura de degradación del polímero que se pretende utilizar en los andamios. El estudio dinámico fue realizado en aire, con un barrido de temperatura de 10 °C/min desde temperatura ambiente hasta 800 °C.

3.4.2 Calorimetría Diferencial de Barrido - DSC

La calorimetría diferencial de barrido (en inglés, *Differential Scanning Calorimetry, DSC*) es una técnica que permite analizar propiedades térmicas de los materiales. El método consiste en medir la diferencia de los calores absorbidos por una muestra de material de masa conocida por un lado, y una muestra de referencia (aire u otro material) por el otro, cuando ambas se exponen a una rampa de temperatura. Mientras la muestra experimenta cambios físicos o químicos dados por la aplicación de calor (cristalización, fusión, solidificación, oxidación, etc.) se producen

cambios en la energía interna, esto es, en el calor absorbido, respecto al que absorbe la referencia. Las diferencias de calor medidas entre la muestra y la referencia son almacenadas en tiempo real y con esos datos se puede calcular la temperatura a la cual se dan estos cambios fisicoquímicos en la muestra [44].

Gracias a la colaboración de la Dra. Gabriela Leyva, del Departamento de Física de la Materia Condensada, en el centro Atómico Constituyentes de la Comisión Nacional de Energía Atómica, se realizaron ensayos con un equipo de DSC Q2000 marca TA Instruments. Se analizaron muestras de diferentes etapas del proceso de fabricación para observar el estado del material en cada una de ellas.

- PHBV en polvo (sin procesamientos)
- Filamento de PHBV (1er proceso térmico)
- Impresión de PHBV (2do proceso térmico)
- Filamento de PHBV+BG(4%) (1er proceso térmico)
- Impresión de PHBV+BG(4%) (2do proceso térmico)

Para los ensayos se utilizaron muestras de ~10 mg y rampas de temperatura de ± 10 °C/min, llevando las muestras a -40 °C y luego a 190 °C, con un posterior enfriamiento hasta temperatura ambiente.

Este estudio se focalizó en la temperatura de fusión (pico endotérmico), temperatura de cristalización (pico exotérmico) y la fracción cristalina. Esta última se puede calcular a partir del gráfico de calorimetría diferencial de barrido y el valor de referencia de la entalpía de fusión material [45]. En este caso, se utilizó el valor de referencia del polihidroxibutirato, PHB, reportado en bibliografía, dado que el porcentaje de valerato en el PHBV es muy bajo.

Fracción Cristalina:
$$X_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0}$$

donde ΔH_f es el calor de fusión obtenido a partir del área bajo el pico de fusión, ΔH_f^0 es el calor de fusión para el PHB totalmente cristalino (146 J/g) [46].

El área bajo el pico se calculó con el programa Origin Pro.

Para el caso de las mezclas con BG (4 % m/m), se debe multiplicar X_c por el factor 0,96, lo que representa el porcentaje real de polímero en la muestra.

3.5 Fabricación de piezas por impresión 3D para análisis y caracterización

Para los análisis morfológicos y mecánicos (secciones 3.6 y 3.8) se diseñaron y elaboraron muestras de acuerdo a los estándares correspondientes. Se presenta la Figura 11 que explica el proceso fabricación de dichas piezas:



Figura 11: Diagrama de flujo del proceso de producción de piezas por impresión 3D.

3.5.1 Diseño

Todos los ensayos propuestos en esta tesis requieren diseñar una pieza con una geometría particular. La mayoría de los diseños se ajustan a normas internacionales que especifican formas, dimensiones y tolerancias. Otros diseños han sido ideados en el laboratorio para poder caracterizar otras propiedades que no son contempladas por la normativa vigente. En cualquier caso, para el diseño se empleó la herramienta gráfica SolidWorks®, cuyos archivos se almacenaron en formato .sldprt, editable por dicho programa, y en formato .stl para su utilización en los programas que generan el archivo .gcode con el que se controla el funcionamiento de la impresora 3D. La Figura 12 muestra la forma de una probeta de tracción según norma ASTM D638-02.

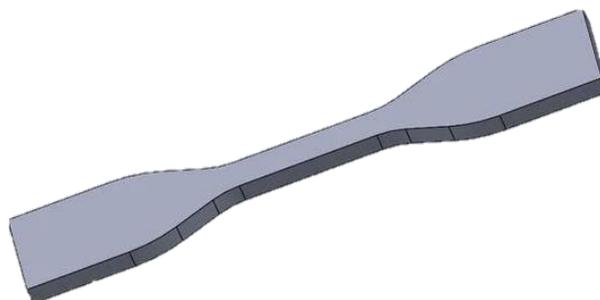


Figura 12: Diseño de probeta de tracción en SolidWorks®

3.5.2 Definición de parámetros de impresión

El archivo .stl es importado al Slic3r. Este software libre permite definir condiciones de impresión. El usuario puede previsualizar cómo quedará la impresión y guardar las instrucciones en el archivo de formato .gcode. Se presenta en la Figura 13 una captura de pantalla del uso del Slic3r con el diseño para imprimir la probeta de tracción de la Figura 12.

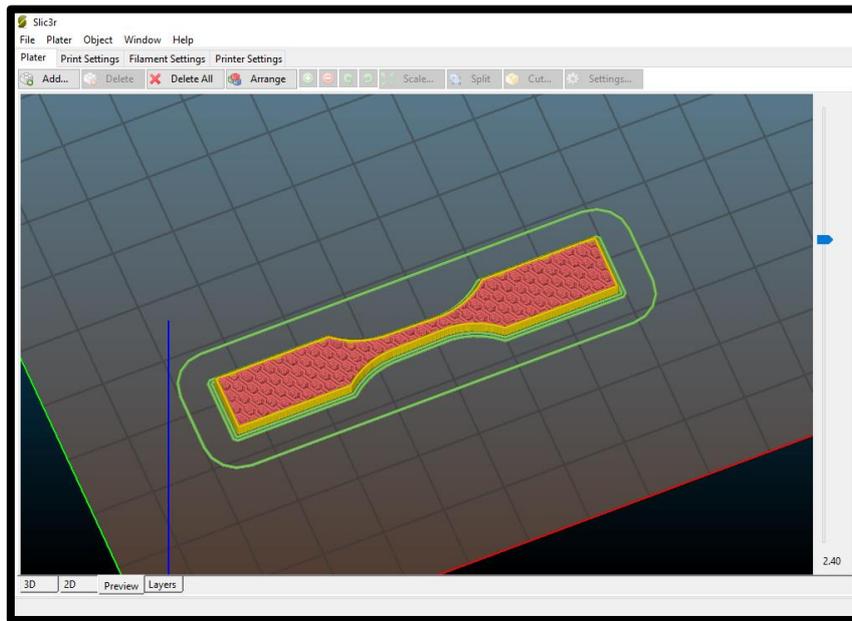


Figura 13: Captura de pantalla de Slic3r. Se destaca la dirección de impresión de cada capa, que forma un ángulo con la dirección longitudinal de la muestra.

3.5.2.1 Parámetros relevantes

Son decenas de parámetros los que uno puede configurar desde los programas de impresión 3D. Se describen a continuación los que se consideraron más relevantes para el proyecto y en algunos se mencionan los valores empleados.

- Diámetro de pico extrusor: Se utilizaron picos de acero inoxidable de 0,2 mm, 0,5 mm, 0,6 mm de diámetro interno.
- Temperatura de pico extrusor: Fijada en 200 °C. Necesaria para fundir los materiales considerando la transferencia de calor con el medioambiente.
- Temperatura de la base: Entre 85 y 100 °C. Se calienta la base para mejorar la adhesión del material una vez depositado.
- Velocidad de impresión: Menor a 15 mm/min en todos los casos. La velocidad de impresión determinará la resolución espacial, los tiempos de impresión, y la adhesión entre capas.

- Porcentaje de relleno: De 0 a 100 %. Representa la cantidad de filamento utilizada para rellenar un área determinada. Se presenta la Figura 14 a modo de ejemplo:

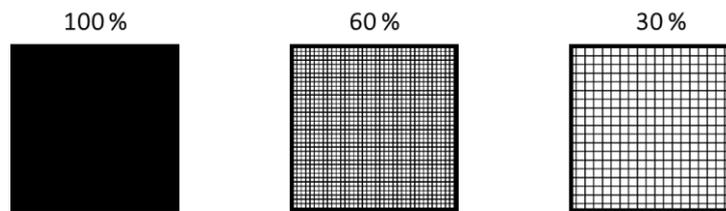


Figura 14 Porcentaje de relleno

- Patrón de relleno: En este proyecto se utilizaron patrones rectilíneos. Representa la forma con la cual se genera el trazado de filamento en cada capa. Se presentan algunos estilos en la Figura 15 a modo de ejemplo:

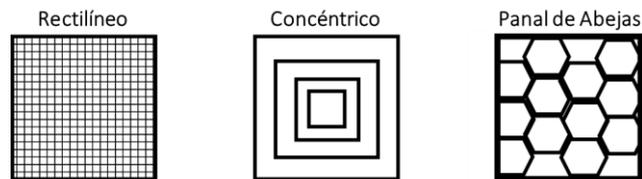


Figura 15: Patrones de Relleno

- Altura de capa: Desde 0,1 al valor del diámetro del pico utilizado (en mm). Representa el espesor de cada capa impresa. Si se quiere fabricar una pieza de 1 mm de espesor y se la divide en capas de 0,2 mm, la impresión tendrá 5 capas. Se profundizará la importancia de este parámetro en la sección 3.6.2.
- Perímetros externos: Habilitado o Deshabilitado. La utilización o no de perímetros externos determina la existencia de paredes verticales en la pieza. Se presenta la Figura 16 a modo de ejemplo:

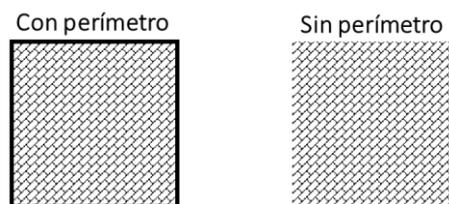


Figura 16: Perímetros externos

- “Piso” y “Techo”: Habilitados o deshabilitados. Realiza la impresión de una primer y/o última capa con 100 % de relleno, lo que genera un piso o techo de la pieza totalmente rellenos con material. En el presente proyecto se mencionarán como “capas externas”.

3.5.3 Impresión 3D

Realizado con la impresora 3D Codex 2020. El archivo .gcode contiene las instrucciones de impresión, lo que incluye el seccionado de la pieza capa por capa y la trayectoria del pico. La información es trasladada mediante un dispositivo de almacenamiento de memoria a la impresora 3D para su lectura. Una vez dadas las condiciones se procede a imprimir la pieza. Al finalizar la impresión, se espera hasta que la base de impresión retome la temperatura ambiente y se retira la pieza. En la Figura 17 se presenta la probeta impresa.



Figura 17: Probeta fabricada con la impresora 3D Codex 2020.

3.6 Análisis morfológico

3.6.1 Fidelidad y reproducibilidad de impresión

La resolución de las impresiones depende de diversos factores: el diseño, la temperatura de impresión, el pico utilizado, la altura de capa, velocidad, condición ambiental, incluso la calibración de la impresora: dos impresoras de misma marca y modelo pueden presentar resultados muy diferentes. Excede al objetivo de este trabajo hacer un análisis en profundidad de la totalidad de estos parámetros, pero se plantea con este estudio una idea del potencial productivo, la tolerancia y la versatilidad que permite esta técnica de fabricación.

Las dimensiones de piezas simples de PHBV impresas se midieron con un calibre Somet de acero inoxidable para comprobar tanto la fidelidad como la reproducibilidad de impresión. Se entiende por buena fidelidad que la pieza impresa coincida en forma y tamaño con el modelo del objeto 3D. Mientras que se califica como buena reproducibilidad si existe similitud en las dimensiones de piezas fabricadas a partir de un mismo modelo 3D.

Se valorizó la fidelidad indicando el promedio de la variación absoluta de las dimensiones de 5 ejemplares respecto al diseño original. Se valorizó la reproducibilidad indicando los resultados porcentuales del desvío estándar entre los ejemplares respecto al diseño original.

Para el análisis se aprovecharon algunas de las piezas fabricadas para ensayos mecánicos de impacto, fractura cuasi-estática y flexión, dado que son piezas de tamaños y morfologías diferentes, y todas fueron impresas con los mismos parámetros de impresión. Se usaron 5 muestras de cada tipo y todas fueron impresas en la misma posición de la base de impresión. La

Figura 18 y la Figura 19 ilustran las mediciones de las dimensiones de una probeta para ensayos de fractura.

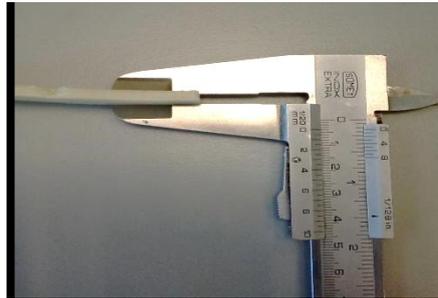


Figura 18: Probeta medida con calibre

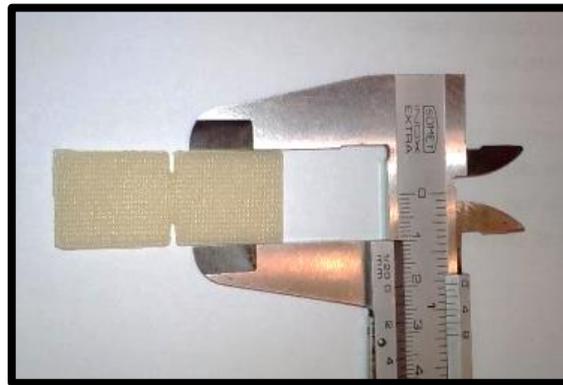


Figura 19: Probeta medida con calibre

3.6.2 Análisis de imágenes

Se analizaron imágenes de microscopía óptica y electrónica con el fin de determinar el tamaño de poro formado y el ancho de línea impreso según los siguientes parámetros de impresión:

- Diámetro de pico.
- Porcentaje de relleno.
- Altura de capa.

A continuación, se presenta la Figura 20 que servirá de modelo para comprender el estudio realizado.

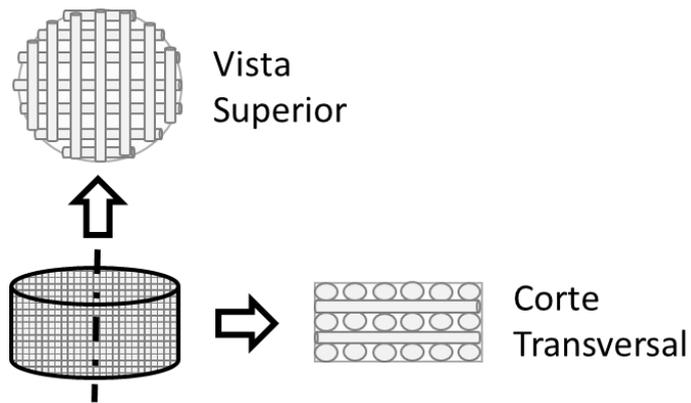


Figura 20: Esquema de la vista superior y vista de corte transversal de un andamio impreso

Se definen como canales verticales a los espacios internos formados entre las líneas de material que se observan desde la vista superior. Se definen como canales horizontales a los espacios internos formados entre las capas de material vistos desde un corte transversal.

Además, es necesario explicar la importancia de la “altura de capa”. Éste es un parámetro que define cuánto se aleja en el eje Z la mesa de impresión del pico de impresión en cada cambio de capa. Dicho parámetro depende, en primera medida, del diámetro del pico de extrusión, y puede ser definido automáticamente por el sistema o puede ser modificado a criterio del usuario. Estas modificaciones definirán tanto la calidad de la superficie externa del objeto impreso como el espacio vacío que queda entre cada capa.

Se explica la necesidad de modificar este parámetro con un ejemplo numérico:

Caso A: Si uno utiliza un pico de impresión de 0,6 mm de diámetro y define la altura de capa en 0,8 mm, dejará 0,2 mm de margen de aire entre cada capa, por lo que las capas no lograrán adherirse entre sí.

Caso B: Si con el mismo pico (0,6 mm) se elige una altura de capa de 0,1 mm, el material estará tan encimado en el eje z que probablemente se termine aglomerando en la misma capa, teniendo en cuenta que el pico se encuentra a temperaturas muy altas y continuará derritiendo el material impreso en capas inferiores.

Caso C: La altura ideal entre capas consecutivas depende de cada caso y se suele ajustar de manera experimental. Lo que se recomienda desde el manual del Slic3r es definir este parámetro un poco menor al diámetro del pico, de modo que el filamento no quede “colgando en el aire” y que tampoco se aglomere con lo previamente impreso. De esta manera se logra una eficiente adhesión entre capas. Para el ejemplo mencionado, con un diámetro de pico de 0,6 mm, se puede suponer que una altura de 0,5 mm daría buenos resultados [47].

En la Figura 21 se observa la representación gráfica de los tres casos mencionados.

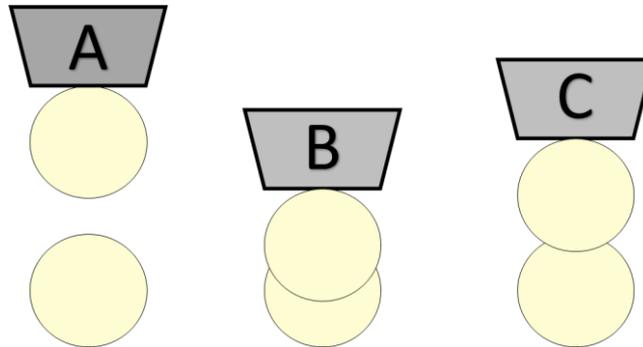


Figura 21: Altura de capa y adherencia entre capas.

3.6.2.1 Canales Verticales

Primero, se imprimieron piezas rectangulares de 1 cm x 3 cm y cuatro capas de espesor. Las piezas fueron impresas con picos de acero inoxidable de 0,2 mm, 0,5 mm y 0,6 mm de diámetro y con porcentajes de relleno de 40 %, 50 % y 60 %. Luego, se obtuvieron imágenes de la vista superior de estas piezas.

La adquisición y digitalización de las imágenes se realizaron con una lupa digital MIYOSHI, presentada en la Figura 22. Se utilizaron 2 muestras por cada tipo de pieza a analizar y 20 canales por muestra analizada, obteniendo el valor promediado de 40 canales por tipo de pieza. El mismo criterio se usó para la medición del ancho de línea promedio de material impreso, utilizando 10 líneas de material por muestra, de modo tal que se obtengan 20 líneas por tipo de pieza.



Figura 22: Lupa digital Mishoyi

Las imágenes adquiridas en formato .jpeg se procesaron con el programa ImageJ. El procesamiento constó en binarizar y filtrar las imágenes de modo tal que se pueda cuantificar

el área de los canales internos generados por la trama impresa. Se describe el paso a paso del proceso:

1. Conversión a imagen en 8 bits.
2. Disposición de escala en milímetros según píxeles, a partir de un patrón de longitud.
3. Ajuste de brillo y contraste.
4. Binarización (se pasa de escala de grises a imagen en blanco y negro).
5. Filtrado con herramientas del sistema según la necesidad: erosión, dilatación, cierre y llenado de agujeros. Esto se detalla más adelante en la sección 3.10.2.
6. Conteo y medición automática de canales (color negro) con la función “Analizar partículas”.
7. Obtención de área promedio y desvío estándar en Excel.
8. Medición del ancho de las líneas impresas en el eje vertical y horizontal
9. Obtención de ancho promedio y desvío estándar en Excel.

Aclaración: Por cuestión de costos, se utilizó principalmente filamento de PHBV dado que el objeto de este estudio es realizar una caracterización meramente morfológica, y se vio que la presencia de BG no afecta significativamente los resultados de estos parámetros.

3.6.2.2 Canales Horizontales

Para establecer cómo afectan el diámetro del pico utilizado y la altura de capa definida en las impresiones a los canales horizontales de los andamios se analizaron imágenes de cortes transversales obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

El valor de altura de capa configurado fue de un 75 % a 80 % del diámetro de pico.

El proceso fue el siguiente:

1. Corte transversal de las piezas sumergidas en nitrógeno líquido para fragilizarlas y evitar que se deformen al ejercer presión con una trincheta. Así se preservan la altura de capa y el ancho de línea impreso.
2. Obtención de imágenes de microscopía electrónica de barrido (Philips XL30 TMP New Look del Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia).
3. Visualización de imágenes con ImageJ.
4. Conversión a imagen en 8 bits.
5. Disposición de escala en mm según píxeles.
6. Ajuste de brillo y contraste.
7. Binarización (imagen en blanco y negro).

8. Filtrado con herramientas del sistema según la necesidad: erosión, dilatación, cierre y llenado de agujeros.
9. Medición de distancias entre punto medio de una capa respecto a su capa anterior y posterior.

3.7 Tratamiento superficial con BG

Se trataron andamios fabricados con filamento de PHBV y PHBV+BG(4%).

Tratamiento del andamio

1. El andamio fabricado se sumerge 7 minutos en cloroformo para ablandar levemente la superficie.
2. Luego, se sumerge el andamio en una solución de 0,055 g de BG cada 500 ml de cloroformo y se lo deja 2 minutos dentro de un sonicador para lograr la adhesión superficial del BG.
3. Se retira el andamio de dicha solución y rápidamente se coloca en estufa a 170 °C durante 5 minutos, para evaporar el cloroformo y ablandar aún más la superficie polimérica, de modo tal que el BG se ancle al andamio.
4. Finalmente, la pieza permanece un día en un desecador a temperatura ambiente para eliminar cualquier remanente de cloroformo.

Tras finalizar el tratamiento, se obtienen imágenes de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.

3.8 Propiedades Mecánicas

El objetivo de este análisis es comprender el comportamiento mecánico de los andamios y cómo afectan los distintos modos de impresión al resultado final. Por este motivo, los resultados serán mostrados en base a los parámetros de impresión considerados más relevantes, derivados de la propia experimentación con el material y de realizar una revisión bibliográfica del impacto que los mismos tienen en el comportamiento final de las piezas [48], [49]. En todos los casos, se aclaran las dimensiones nominales según norma de las piezas utilizadas.

La normativa para ensayar andamios adaptados al paciente, desarrollados a partir de impresoras 3D por deposición de material fundido, es imprecisa o insuficiente. Por lo tanto y al igual que otros autores, se utilizaron normas que suelen aplicarse en caracterización de polímeros

procesados con otras tecnologías [50]. Dichas normas, al haber sido ideadas con otro propósito, no contemplan la fabricación de piezas con orificios, o “canales”. Por este motivo, se realizaron ensayos con distintas probetas, intentando abarcar todas las opciones posibles: tanto las que solicitan las normas para la caracterización de los materiales, como las necesarias para poder caracterizar nuestros andamios en condiciones semejantes a las de su aplicación real.

En todos los casos, y al igual que otros autores, el cálculo de la tensión ejercida en las probetas ha sido realizado en base al área transversal nominal. Esto es, que se considera al área como un todo, sin importar espacios huecos dados por la naturaleza de su diseño [51], [52]. En este trabajo no se calcula el valor de área efectiva, esto forma parte de una discusión que requiere un desarrollo muy profundo tanto en la anisotropía de las piezas impresas como en la técnica para la determinación del área real. Excede los objetivos del proyecto final, pero se entiende que es una discusión actual en la comunidad científica.

Una parte de los ensayos se realizaron junto a profesionales del Grupo de Investigación en Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos (BBT) de la Universidad Politécnica de Catalunya (UPC), dentro del marco de las becas de movilidad internacional, becas “PIME”, que ofrece la UNSAM. Otra parte de los ensayos se realizó en colaboración con el Dr. Ezequiel Pérez, en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI).

3.8.1 Ensayos de Tracción

Este tipo de ensayo sirve para observar el comportamiento del material cuando es sometido a una tracción: una máquina de ensayos estira una probeta “dogbone” (trad. Hueso de perro) o una porción de filamento a una velocidad fija (mm/min), mientras la celda de carga registra la fuerza ejercida y con esto se obtiene una curva de esfuerzo mecánico de tracción vs deformación, donde:

Esfuerzo mecánico de tracción: $\sigma = F/A$ [MPa]

donde F es la fuerza que ejerce la máquina de ensayos y A = 10,2 mm² es el área transversal nominal de la probeta “dogbone”.

Deformación: $\varepsilon (\%) = \frac{\Delta l}{l_0} \times 100$ [Adimensional]

donde Δl es el desplazamiento del cabezal de la máquina

de ensayos y $l_0 = 25,4$ mm es la longitud inicial de la probeta “dogbone”.

Se obtienen valores de módulo tensil, E (GPa), deformación a la rotura, ϵ (%), y la tensión máxima σ_{max} (MPa).

En la Figura 23 se observa en A, la probeta tipo “dogbone”, en B, la probeta siendo sometida al proceso de tracción y en C, la probeta fracturada una vez terminado el proceso de tracción. En la Figura 24 se observa la curva de tensión vs deformación asociada al proceso de tracción. En ella se observa cómo se obtienen los valores que nos permiten caracterizar al material.

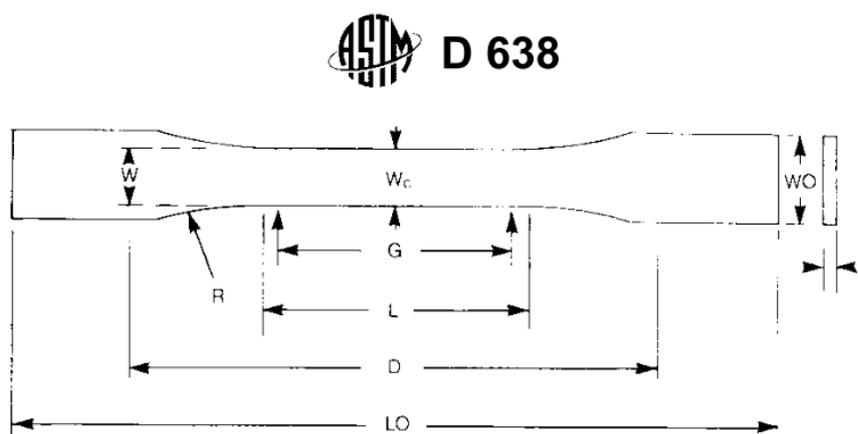


Figura 23: Probeta TIPO V según norma ASTM D638-02. Dimensiones: $W = 3,18$ mm | $L = 9,53$ mm | $W_0 = 9,53$ mm | $L_0 = 63,5$ mm | $G = 7,62$ mm | $D = 25,4$ mm | $R = 12,7$ mm

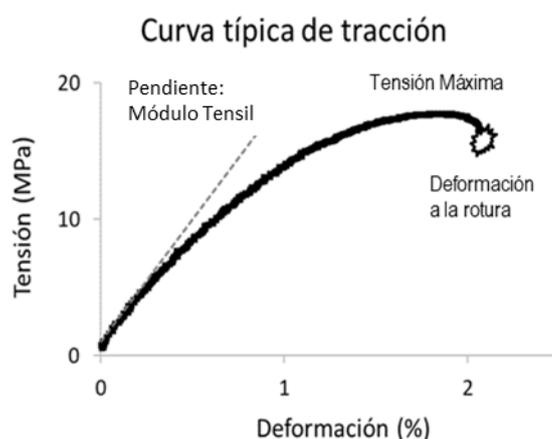


Figura 24: Curva típica de ensayo de tracción.

La pendiente inicial representa el módulo tensil. Se registra también la tensión máxima y el punto donde la pieza se fractura.

Para el análisis de tracción se utilizó la norma ASTM D638-02 [53]. Se ensayaron el filamento obtenido por extrusión y probetas “dogbone” en una máquina de ensayos Bionix MTS 858.

Además, se ensayaron probetas sin perímetros externos, ni tapa ni base, situación que se asemeja a la aplicación buscada.

Se realizaron 5 ensayos por tipo de muestra con una celda de carga de 500 N a una velocidad de 1 mm/min a temperatura ambiente.

3.8.2 Ensayos de Compresión

En este tipo de ensayo se comprime una probeta cilíndrica a una velocidad fija (mm/min) y se registra el esfuerzo mecánico de compresión en función de la deformación, donde:

Esfuerzo mecánico de compresión: $\sigma_c = F/A$ [MPa]

donde F es la fuerza que registra la celda de carga y $A = 63,5 \text{ mm}^2$ es el área transversal nominal de la probeta cilíndrica.

Deformación: $\varepsilon (\%) = \frac{\Delta l}{l_0} \times 100$ [Adimensional]

donde Δl es el desplazamiento de la máquina durante el ensayo, y $l_0 = 19 \text{ mm}$, es la altura inicial de la probeta cilíndrica. El diámetro de las probetas usadas es de 9 mm.

Se obtienen valores de módulo en compresión, E (GPa) y el límite de proporcionalidad elástica en compresión, σ_e (MPa).

En la Figura 25 se observa la pieza al comienzo (A) y al final (B) del proceso de compresión; se destaca la deformada plástica que “abarrila” la muestra. En la Figura 26 se observa la curva de tensión vs deformación asociada al proceso de compresión. En ella se indica cómo se obtienen los valores que nos permiten caracterizar al material.

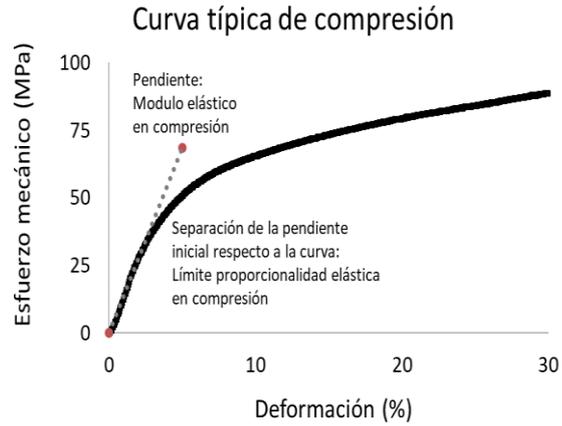
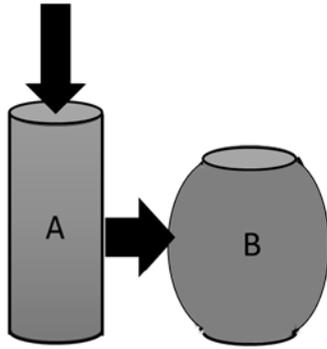


Figura 25: Esquema de una probeta para ensayo de compresión uniaxial: A estado inicial y B estado final, probeta “abarrilada”.

Figura 26: Curva típica del ensayo de compresión. Se observan los valores obtenidos en línea negra continua. La pendiente inicial representada por la línea punteada es el módulo en compresión. El punto en el cual se separan la pendiente inicial de la curva real se considera el límite de la proporcionalidad elástica.

Para el análisis de compresión se utilizó la norma ASTM D695-02 [54]. Se evaluaron piezas cilíndricas en una máquina de ensayos Bionix MTS 858.

Se realizaron 5 ensayos por tipo de muestra con una celda de carga de 25 kN a una velocidad de 1 mm/min a temperatura ambiente.

3.8.3 Ensayos de Flexión

Este tipo de ensayo sirve para caracterizar el comportamiento del material cuando se somete la pieza a una flexión en 3 puntos, que se ilustra en la Figura 27. La muestra es un paralelepípedo de 6 mm de ancho, 3 mm de espesor y 60 mm de largo, que se dispone con su longitud mayor horizontal sobre dos apoyos distanciados en 20 mm (dos de los tres puntos). El tercer punto se ubica en el centro de la cara superior de la probeta, donde la máquina de ensayos ejerce una fuerza hacia abajo a una velocidad constante (1 mm/min).

El esfuerzo y la deformación en un ensayo de flexión en tres puntos se calculan del siguiente modo:

Esfuerzo mecánico en flexión:
$$\sigma_f = \frac{3 P L}{2 b d^2} \quad [\text{MPa}]$$

donde P es la carga medida en Newton, L = 20 mm es la

distancia entre los puntos de apoyo, b es el ancho de la probeta y d es el espesor de la probeta.

Deformación en flexión:

$$\varepsilon_f = \frac{6 D d}{L^2} \quad [\text{Adimensional}]$$

donde D es la máxima deflexión en el centro de la probeta (desplazamiento del cabezal de la máquina de ensayos).

Se obtienen valores de módulo en flexión, E_f (GPa), deformación a la rotura, ε_f (%) y tensión máxima en flexión, σ_{\max} (MPa).

En la Figura 27 se esquematiza la deformación del material en el ensayo de flexión.

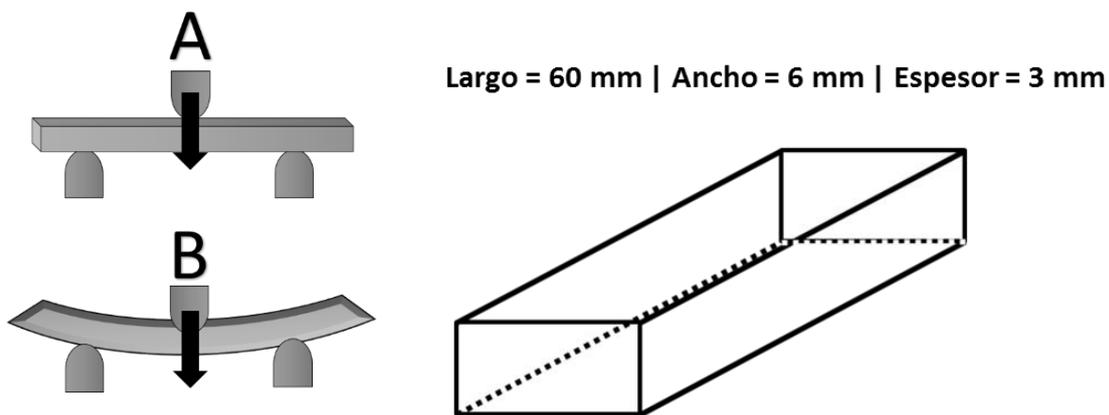


Figura 27: Probeta siendo sometida a ensayo de flexión y dimensiones nominales.

Para el ensayo de flexión en 3 puntos se utilizó la norma ASTM D790-03 y una máquina de ensayos Tinius Olsen h50kt.

Se ensayaron 5 probetas de sección rectangular con 50 % de relleno por diseño con una celda de carga de 500 N, a una velocidad de 1 mm/min y a temperatura ambiente.

3.8.4 Ensayos de impacto

Este tipo de ensayo sirve para observar el comportamiento del material cuando el martillo de un péndulo impacta en la muesca de una probeta "IZOD", como la que se muestra en la Figura 28.

Resistencia al impacto específico: $R_{impE} = \frac{U}{d*L} \quad [J/m^2]$

donde U es la energía absorbida, d = 3,5 mm es el espesor de la probeta de medición y L = 10,5 mm es el ancho de la probeta de medición.

En la Figura 28 se indican las dimensiones relevantes de las probetas IZOD. En la Figura 29 se representan diferentes momentos del ensayo: A, previo al impacto del péndulo; B, cuando el péndulo impacta y comienza el proceso de propagación de la fisura a partir de la entalla; C: fractura completa al final del ensayo.

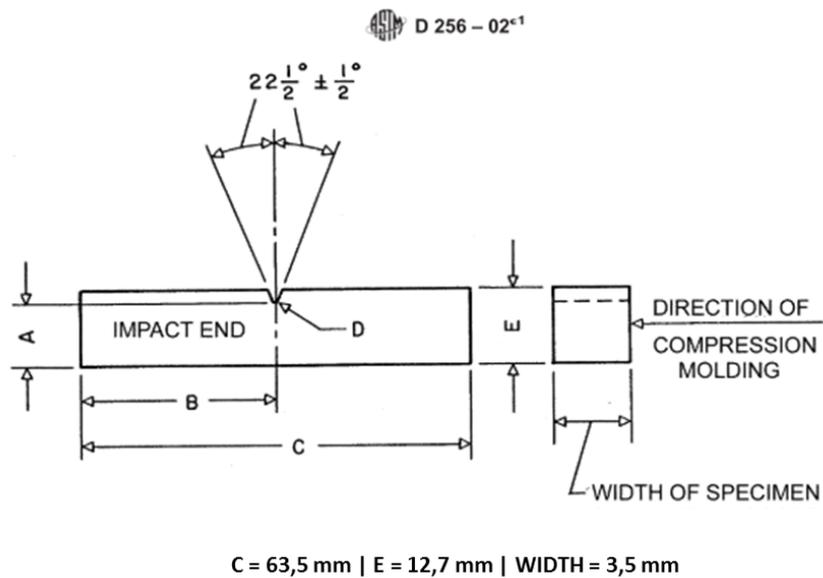


Figura 28: Dimensiones nominales relevantes de las probetas "IZOD". Imagen extraída de la norma ASTM D256-02

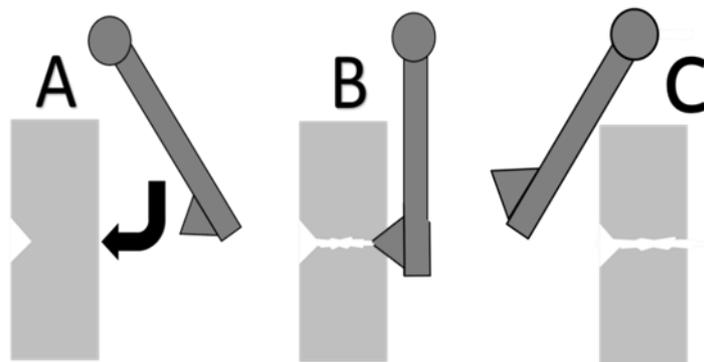


Figura 29: Esquema de diferentes momentos del ensayo de impacto.

Para el análisis de impacto se utilizó la norma ASTM D256-02 [53].

Se realizaron 6 ensayos con probetas "IZOD" con 50 % de relleno.

3.8.5 Ensayos de fractura

Este tipo de ensayo sirve para determinar el comportamiento del material ante la concentración de tensiones que se produce en una pieza rectangular con dos entallas agudas alineadas, sometida a tracción.

Se calcula el factor crítico de intensidad de tensiones, K_{Ic} , que caracteriza la resistencia al inicio de la propagación de fisuras y el trabajo de fractura, W_f , asociado a la energía consumida en generar el plano de fractura.

Factor crítico de intensidad de tensiones: $K_{Ic} \left[\frac{MPa}{\sqrt{m}} \right]$

Tenacidad a la fractura: $W_f \left[\frac{kJ}{m^2} \right]$

La Figura 30 muestra el esquema representativo de las piezas utilizadas.

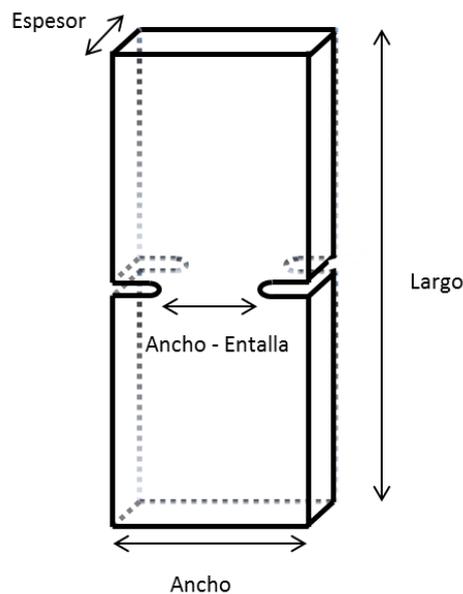


Figura 30: Probeta de Fractura. Largo = 50 mm | Ancho = 20 mm | Espesor = 2,1 mm | Ancho - Entalla = 10 mm.

Para el análisis de fractura se utilizó como guía el trabajo citado en bibliografía [55]. En la zona de menor sección transversal se realiza una entalla (corte con bisturí) por cada lado para direccionar la línea de propagación de la fractura. Las dimensiones son 50 mm de largo, 20 mm de ancho, 2,1 mm de espesor. Luego de las entallas se vuelve a calcular el ancho real según el corte realizado.

Se realizaron 5 ensayos con probetas de 50 % de relleno por diseño, a una velocidad de 1 mm/min a temperatura ambiente.

3.9 Actividad en medio biológico simulado

Una primera aproximación para calificar la capacidad de un biomaterial para formar lazos de unión con el hueso puede hacerse *in vitro*, verificando la capacidad de formar una capa de hidroxiapatita en su superficie en un medio biológico simulado. En este medio simulado la temperatura, el pH y las concentraciones iónicas son casi idénticas a las presentes en el plasma sanguíneo humano [56].

En el presente proyecto se realizó un estudio de actividad en un medio simulado de fluido humano (en inglés, *Simulated Body Fluid, SBF*).

Procedimiento:

1. Preparación del SBF según protocolo presentado por Kokubo & Takadama [56].
2. Elaboración de muestras impresas:
 - de PHBV
 - de PHBV+BG(4%)
3. Se utilizaron piezas impresas de sección cuadrada de 7 mm x 7 mm y 0,5 mm de espesor.
4. Se sumergieron las muestras en la solución con una relación de volumen de 10 a 1.
5. Las muestras se mantuvieron a 36,5 °C con un equipo de baño térmico controlado XMTD-204 marca Arcano.
6. Al cabo de 1, 3, 7, 15 y 30 días se lavaron y secaron las muestras para obtención de imágenes y pesaje, con el fin de verificar la formación de una capa de hidroxiapatita en su superficie.

3.10 Protocolo programa .DICOM a .STL

3.10.1 Programas utilizados

Se estudió el proceso para obtener archivos en formato .STL a través de imágenes médicas .DICOM de manera segura. En primera instancia, se realizó un relevamiento del trabajo de otros autores para definir el proceso.

En segunda instancia, se evaluaron diferentes programas computacionales para trabajar con las imágenes tomográficas .DICOM: Slicer 3D, DeVide, Mango, Amira y Dornheim, siendo los primeros 3 programas de uso gratuito. Los mencionados programas cuentan con herramientas que permiten clasificar, seccionar y procesar las imágenes tomográficas para obtener un objeto digital tridimensional basado en la anatomía del paciente.

El programa elegido para el protocolo fue el 3D Slicer, dada su oferta de herramientas gráficas, facilidad de uso, acceso gratuito y de código abierto. Una vez definido, el objeto puede ser almacenado en diferentes formatos. Se utilizó el formato .stl y, mediante el software MeshMixer se puede optimizar la superficie tridimensional diseñada para facilitar la impresión.

Finalmente, los objetos tridimensionales procesados y optimizados se importan en el Slic3r para generar un .gcode con el que se controlará la impresora. En la sección Resultados se mostrarán imágenes de las distintas etapas del proceso.

3.10.2 Procedimiento

Se presenta el diagrama de flujo de procesos para la generación de archivos .STL a partir de imágenes tomográficas .DICOM.

Las imágenes .DICOM deben superar una resolución espacial mínima de 0,2 mm, dado que es el tamaño del pico de menor diámetro que posee el Lab3Bio para imprimir en la impresora Codex 2020.

En cuanto al procesamiento de la imagen, los programas nos ofrecen diferentes herramientas e interfaces para procesar los archivos. Los pasos siguientes pueden llegar a variar en el orden según el programa a utilizar o la preferencia del usuario. Se describe el camino elegido:

1. *Importación de la imagen* .DICOM en el programa a utilizar
2. *Selección de la región de interés* (en inglés, *Region of Interest, ROI*): Aísla el área de trabajo dentro de la imagen, de la estructura que se pretende emular por impresión 3D.
3. *Generación de la representación en 3D*: También llamado *renderizado*. Con la aplicación de esta herramienta, el conjunto de imágenes confluye en una previsualización del modelo en 3 dimensiones.
4. *Filtrado del tejido óseo por el método "umbral"*: Recordando que los tejidos son representados por una escala de grises según la intensidad de absorción de los rayos X, puede hacerse un filtrado colocando un umbral inferior y superior de dicha escala. Lo

que da como resultado el aislamiento del tejido óseo del resto de los tejidos circundantes.

5. *Utilización de herramientas de segmentación*: Es en esta parte donde los programas presentan mayores diferencias. Sus interfaces facilitan al usuario diversas herramientas para segmentar el volumen que se desea imprimir. Usando cualquiera de las herramientas que se describen a continuación, se genera una región segmentada y el resto de la imagen queda deseleccionada, por lo tanto, no es tenida en cuenta en la representación final. Se mencionan las más útiles:

- a. *Segmentación Manual*: Consta de un método manual a través de una herramienta pincel de tamaño variable para seleccionar en pantalla superficies a incluir o dejar fuera de la representación final del objeto 3D.
- b. *Detección de bordes*: Es una herramienta que permite ubicar las zonas donde ocurren cambios drásticos en la escala de grises entre píxeles contiguos, de modo tal que se puedan seccionar los diferentes tejidos.
- c. *Efecto crecimiento de región*: Se colocan puntos en zonas estratégicas llamados “puntos semilla” de modo que, al aplicarse el efecto, se incorporan píxeles vecinos teniendo en cuenta un criterio determinado (para el caso, su valor en la escala de grises). El resultado es una región que tiene todos los píxeles conectados, sin píxeles aislados y en donde todos ellos cumplen un determinado criterio [57].
- d. *Cierre y apertura (gracias a la conjunción de dos técnicas llamadas dilatación y erosión)*: Son técnicas ampliamente utilizadas en procesamiento de imágenes. La *dilatación* expande la selección de píxeles. La *erosión* contrae la selección de píxeles.

El *cierre* sirve para añadir superficies pequeñas que no han sido seleccionadas previamente por los otros métodos, un modo simple de entender esto es verlo como si se rellenaran “huecos”. Este efecto se logra aplicando la técnica de *dilatación*, seguida del uso de la técnica de *erosión*. La *apertura* recorre el camino inverso, dado que primero se aplica la técnica de *erosión*, para separar las regiones deseadas de regiones que no se necesitan, seguida de la técnica de *dilatación*, para evitar perder información en el resto de la región seleccionada.

6. *Creación del modelo 3D*: Una vez segmentada la superficie, se representa el modelo 3D final. Esto lo realiza una herramienta automática que tienen los programas para generar una superficie en 3 dimensiones del tejido seleccionado. Según el programa utilizado, se puede almacenar en formato .STL o en otros.

7. *Procesamiento de la superficie*: A pesar de todas las segmentaciones y herramientas utilizadas, lo más común es que sea necesario utilizar otro programa que trabaje con la superficie generada para mejorar el modelo 3D. Hay muchos programas que cuentan con herramientas automáticas para corregir errores del modelo. Es posible suavizar la superficie para facilitar la impresión, rellenar agujeros que hayan quedado remanentes tras el procesamiento, y generar material de soporte para facilitar la impresión. Lo único que debe tenerse en cuenta es que estos arreglos no deben desfigurar el modelo anatómico original o afectar la funcionalidad esperada. Finalmente se debe almacenar el archivo como formato .STL para permitir la impresión.

La acción final consta de seleccionar los parámetros de impresión, que variarán según la aplicación buscada. Todo es manipulable y hay incontables modos de imprimir un mismo objeto. En cualquier caso, todo debe quedar registrado digitalmente en un sistema de registros. Los archivos .DICOM, .STL, .AMF, .gcode y todos aquellos archivos que formen parte del proceso de control de fabricación.

4. Resultados

En esta sección se presentan los resultados de todas las caracterizaciones y todos los procesos realizados en el proyecto. Se destaca el logro de fabricar el filamento con los materiales propuestos y con la calidad adecuada para su utilización en una impresora 3D que elabore piezas por adición de material fundido. Además, se demuestra la capacidad de imprimir estructuras adaptables al paciente, con porosidades variables y propiedades mecánicas similares al hueso esponjoso. Finalmente se demostró que los materiales utilizados, en condiciones *in vitro*, dan lugar a formación de hidroxiapatita en su superficie.

4.1 Tratamiento superficial del BG

Realizado el proceso químico detallado en la sección 2.8, se observó un leve efecto de silanización (determinado por técnicas de espectroscopía infrarroja, FTIR, que no se detallan en esta tesis), acompañado por la formación de microcristales de NaCl (cuya composición fue determinada por difracción de rayos x, DRX). En la Figura 31 se pueden distinguir los cristales de NaCl coloreados en verde.

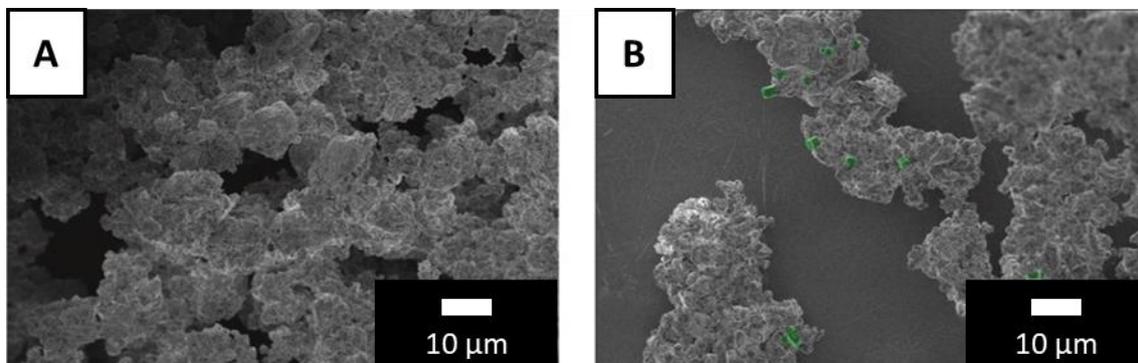


Figura 31: Imagen de SEM de BG sin tratar (A) y tratado con CTMS(B). Se observa formación de cristales de NaCl (color verde) tras el tratamiento de BG con CTMS.

4.2 Filamentos

Se extrudaron filamentos de dos materiales: uno de PHBV —Figura 32— y otro de PHBV+BG(4%) —Figura 33. Ambos tienen sección transversal de $1,7 \pm 0,2$ mm de diámetro.



Figura 33: Filamento de PHBV+BG(4%)

Ambos son de color blanquecino, presentan flexibilidad al ser manipulados y se emplearon posteriormente para elaborar piezas en la impresora 3D.

La Figura 34 presenta un rollo de PHBV+BG(4%) e imágenes SEM de un corte transversal del filamento a distintos aumentos, donde se puede ver cómo se integran los cristales de BG al PHBV.

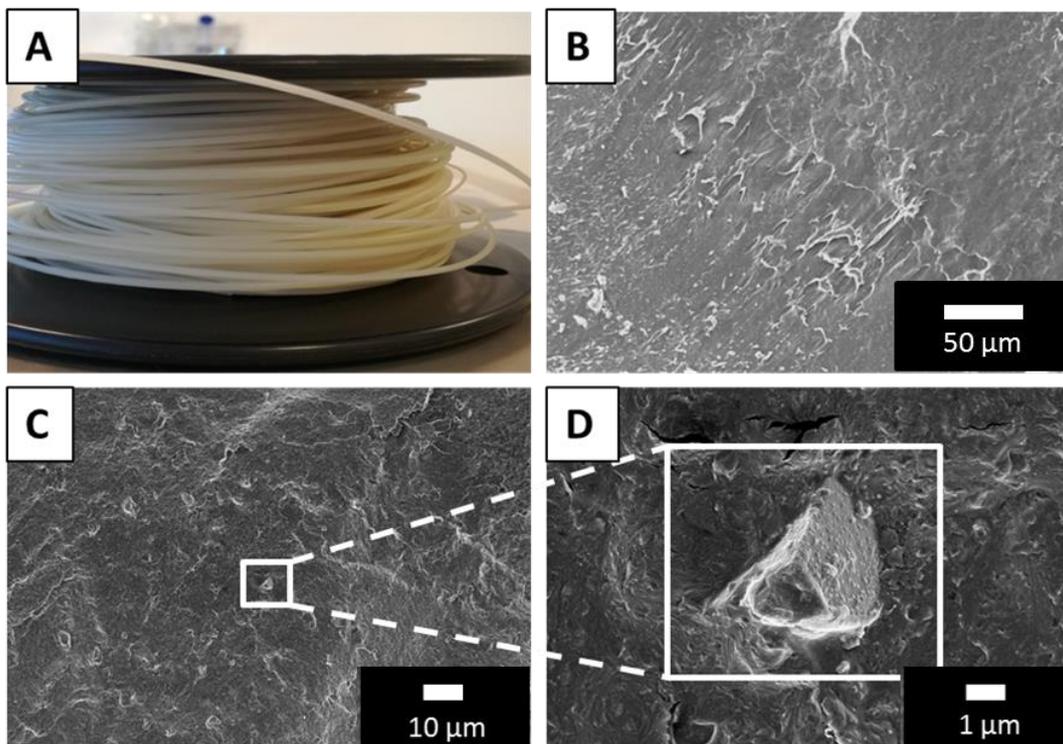


Figura 34: Rollo de filamento de PHBV (A), imágenes SEM de cortes transversales de filamentos de PHBV (B), PHBV+BG(4%) y ampliación en una partícula de BG (C y D, respectivamente)

Como parte de la investigación, también se fabricó filamento de PHBV con BG sin tratar con CTMS. El resultado fue un filamento muy frágil, siendo imposible su utilización en la impresora Codex 2020. El motivo por el cual disminuye la fragilidad del filamento que contiene BG tratado con CTMS se encuentra aún en investigación. En primera medida, se podría asociar a una mejora

en la interacción entre polímero y biovidrio, pero se observó que el efecto de silanización buscado fue pobre. De este modo, los microcristales de NaCl generados en la reacción podrían ocupar un rol importante en la mejora de las propiedades mecánicas del compuesto PHBV+BG(4%).

4.3 Pesaje

Una vez pesados los retazos de filamento, se extrapolaron los valores para cuantificar la cantidad de metros de rollo de filamento que se obtienen con 100 g de material. La Tabla 2 resume dichos resultados.

Tabla 2 Cantidad de material necesario por tipo de filamento.

Material	g/m	Con 100 g se obtienen
PHBV	3	33 m
PHBV+BG (4%)	3	33 m
ABS	2,5	40 m

Se observa que el resultado es el mismo para el PHBV y PHBV+BG(4%). El resultado obtenido del ABS se utiliza para tener un punto de comparación respecto a un filamento ampliamente utilizado.

Para imprimir una pieza de PHBV o PHBV+BG(4%) de 1 cm³ con 50 % de relleno, se emplean aproximadamente 0,8 gramos de material, lo que representaría unos 30 cm de filamento. La Figura 35 resume este resultado.



Figura 35 Cantidad de PHBV necesario para imprimir una pieza de 1 cm³

4.4 Análisis Calorimétrico

4.4.1 Termogravimetría

Se presenta el resultado del análisis termogravimétrico del PHBV en la Figura 36.

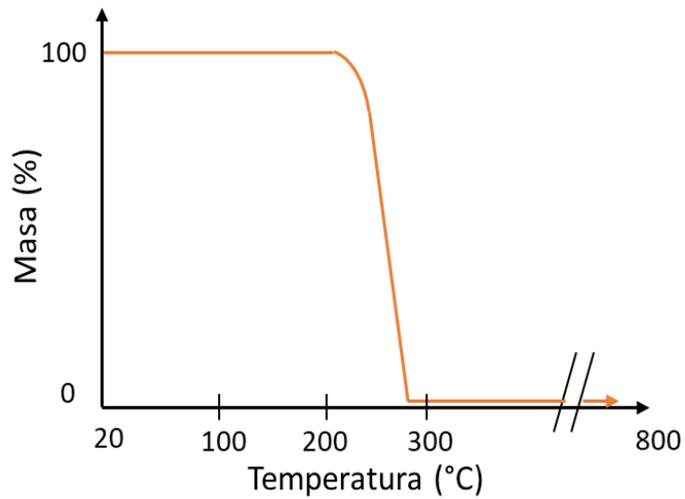


Figura 36: Termograma de PHBV

Se observa una descomposición inicial del 5 % al llegar a $232\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ($T_{5\%}$). La descomposición térmica total se produce a los $287\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.

4.4.2 DSC

La Figura 37 y la Figura 38 se presentan los resultados obtenidos tras los ensayos de calorimetría diferencial de barrido para PHBV y PHBV+BG(4%), respectivamente. Los principales resultados se resumen en la Tabla 3.

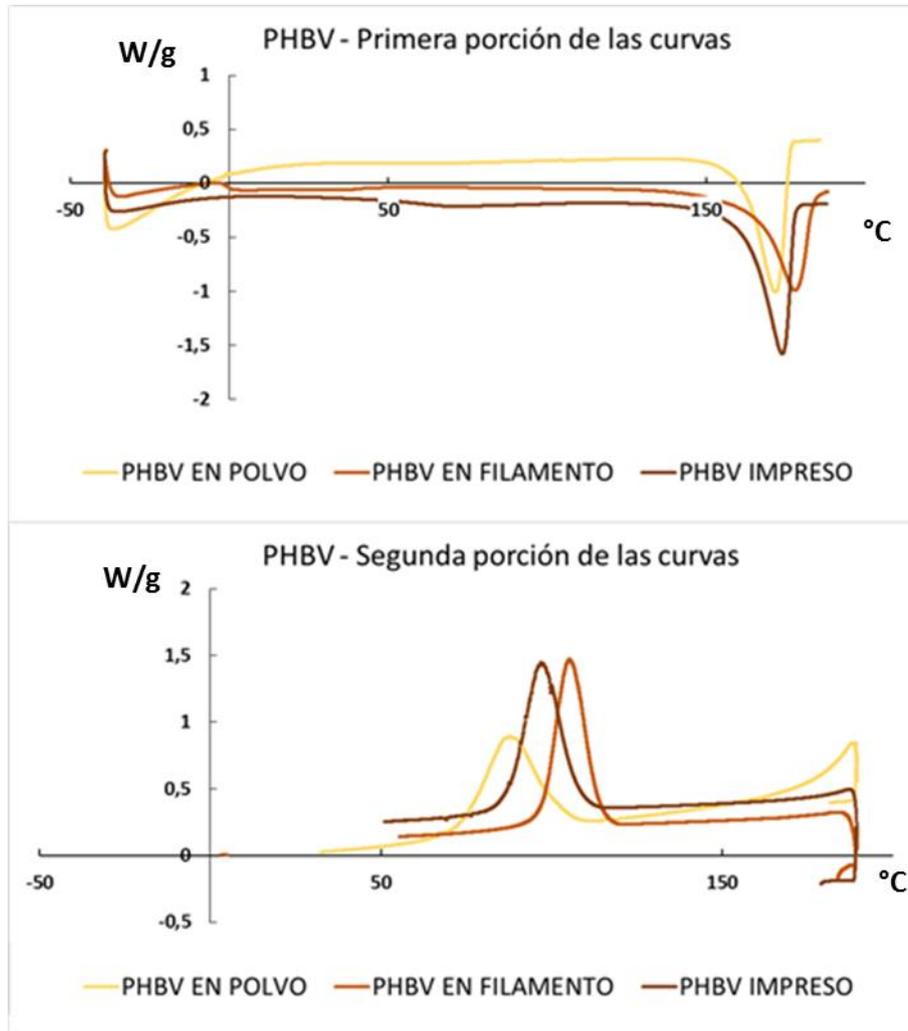


Figura 37: Curvas de calentamiento y posterior enfriamiento de PHBV, para filamentos e impresos.

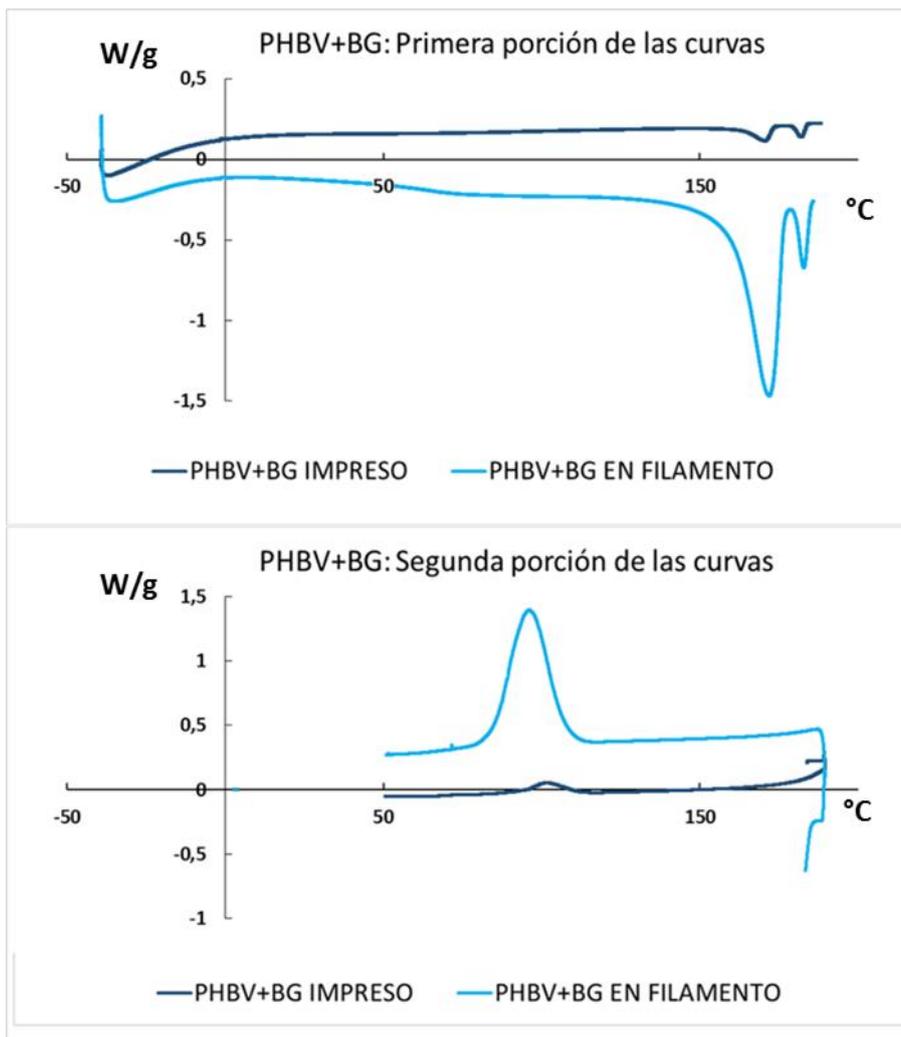


Figura 38: Curvas de calentamiento y posterior enfriamiento de PHBV+BG(4%), para filamentos e impresos.

Tabla 3: Parámetros térmicos de PHBV y PHBV+BG(4%) según la etapa del proceso de fabricación.

	PHBV Polvo	PHBV Filamento	PHBV Impreso	PHBV+BG (4%) Filamento*	PHBV+BG (4%) Impreso*
T. Fusión (°C)	172	179,5	175	171 y 182	170 y 182
T. Cristalización (°C)	91	104	95	94	101
Cristalinidad (%)	62	42	58	51	Hay que repetir la medición

* Se detectaron dos picos de fusión. Para las temperaturas de fusión y cristalización, en todos los casos se considera un error de ± 2 °C. Para la cristalinidad, en todos los casos se considera un error de ± 5 %.

Lo primero que se observa en la tabla es el rango de temperaturas de fusión de los materiales analizados, que oscila entre los 172 °C y 182 °C. Si se comparan los resultados del DSC con los del TGA, se puede garantizar que el proceso de extrusión y posterior impresión 3D no alcanza a degradar al polímero. En primer lugar, el punto de fusión del material es lo suficientemente inferior al punto de degradación. En segundo lugar, dada la velocidad a la que el filamento transita por la boquilla de extrusión, el tiempo de calentamiento es breve.

En cuanto a la temperatura de cristalización, los valores que van de los 91 °C a los 104 °C. Respecto a la cristalinidad del PHBV, se observó que ésta se modifica según los distintos tratamientos, con una leve tendencia a la reducción al hacer el filamento, que luego se revierte con el nuevo tratamiento térmico durante la impresión.

Con el agregado de BG tratado con CTMS, puede observarse un doble pico de fusión. En el ensayo realizado tras el proceso de impresión con este material, dada la forma de la curva y el resultado atípico, podría haber habido un error en el ensayo. Queda pendiente repetir el estudio para desestimar errores y analizar los nuevos datos.

4.5 Piezas Impresas

A continuación, se presentan imágenes de las piezas impresas.

La Figura 39 muestra una pieza impresa para el análisis morfológico.

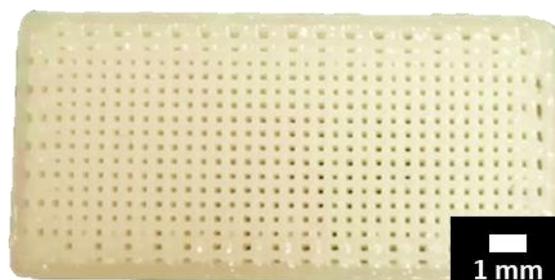


Figura 39 Pieza impresa para análisis morfológico

La Figura 40 muestra dos cilindros impresos para los ensayos de compresión.



Figura 40: Cilindros de PHBV

La Figura 41 muestra una pieza impresa para ensayos de tracción.

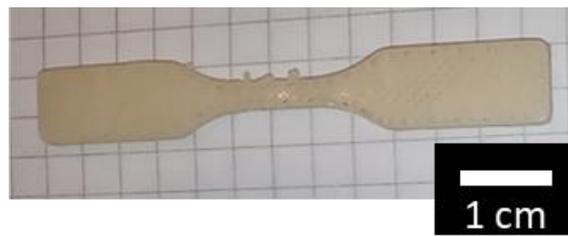


Figura 41: Probeta de tracción de PHBV

En la Figura 42 se observa una pieza impresa con pico de bronze. Se puede distinguir un color diferente en la parte superior de la imagen. Esto es un residuo que puede aparecer al imprimir PHBV con pico de bronze.



Figura 42: Pieza cilíndrica impresa con pico de bronze

En la Figura 43 se observa una pieza impresa con PHBV+BG(4%).

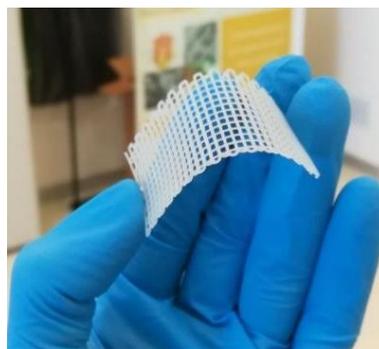


Figura 43: Pieza de dos capas impresa con PHBV+BG(4%)

4.6 Análisis Morfológico

A continuación, se presentan los resultados del análisis morfológico de los andamios fabricados.

4.6.1 Fidelidad de impresión

La Tabla 4 resume los resultados de la medición de diferentes diseños fabricados con PHBV en la impresora 3D. La diferencia es del valor absoluto promedio de 5 piezas respecto del diseño digital, y el desvío entre piezas brinda información acerca de la reproducibilidad del método de fabricación.

Tabla 4: Fidelidad de impresión

Pieza	Dimensión	Valor por Diseño (mm)	Diferencia (mm)	Desvío entre piezas (%)
Fractura 	ancho	20,00	0,07	0,5 %
	largo	50,00	0,19	1,1 %
	espesor	2,10	0,08	3,3 %
Impacto 	ancho	12,70	0,17	1,2 %
	largo	63,50	0,05	1,5 %
	espesor	3,50	0,05	4,0 %
Flexión 	ancho	6,00	0,05	1,5 %
	largo	60,00	0,04	1,5 %
	espesor	3,00	0,05	1,3 %

Diferencia: Promedio de la diferencia absoluta de 5 piezas respecto al diseño original.

Desvío entre piezas: Resultado porcentual del desvío estándar entre las piezas respecto a la medida original.

En la tabla se observa que tanto las diferencias como los desvíos son pequeños. Se puede distinguir que el espesor representa la dimensión con mayor variabilidad entre piezas de un mismo tipo.

4.6.2 Canales Verticales

A continuación, en las Figura 44 y 45 se muestran imágenes representativas de todas las imágenes obtenidas y procesadas en el estudio realizado.

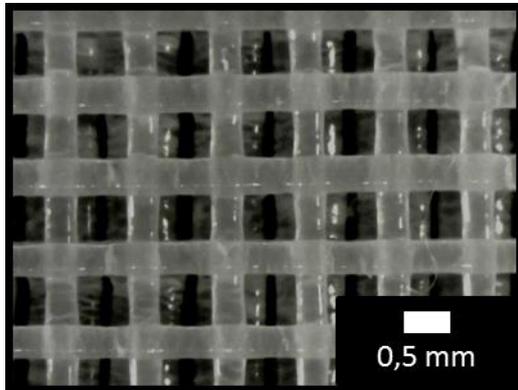


Figura 44: Imagen original de la trama impresa en PHBV

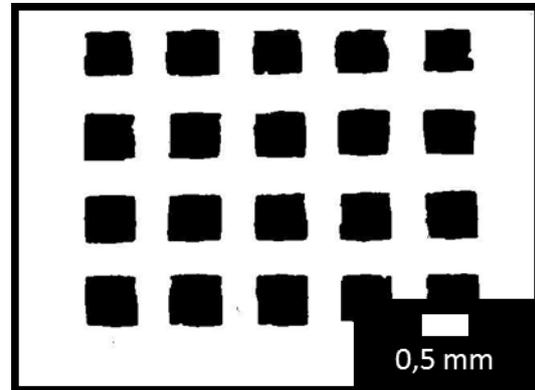


Figura 45: Imagen binarizada y filtrada de la trama original.

En la Figura 45 se puede observar el procesamiento realizado. La imagen ha sido binarizada y se observa en color negro los canales formados tras la impresión del andamio y en blanco, la traza de material. Los canales incompletos ubicados en los bordes de las imágenes han sido eliminados con herramientas del programa para el correcto cálculo de las áreas en la región de interés.

4.6.2.1 Área de los canales verticales

La Figura 46 muestra la relación entre el área de los canales y el material utilizado.

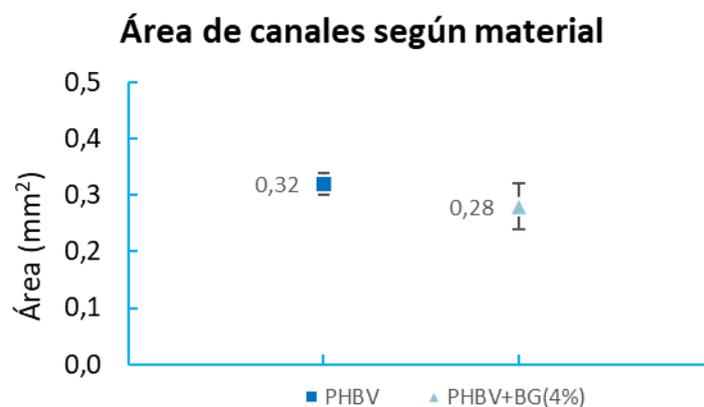


Figura 46: Área de los canales según el material utilizado para la impresión 3D. Para esta prueba se imprimieron probetas del mismo tipo (pico 0,5 mm; relleno en 50 %), pero con diferente filamento. Uno con PHBV+BG(4%) y otro de PHBV.

Lo que se observa es que no hay un cambio significativo tras la utilización del filamento de PHBV+BG(4%). El desvío estándar del estudio es del mismo valor que la diferencia entre las mediciones promediadas de los canales formados en los distintos materiales (0,04 mm²), lo que justifica el uso de PHBV para el resto de los análisis de este tipo.

La Figura 47 presenta la relación entre el área de los canales y el diámetro del pico utilizado en la impresión.

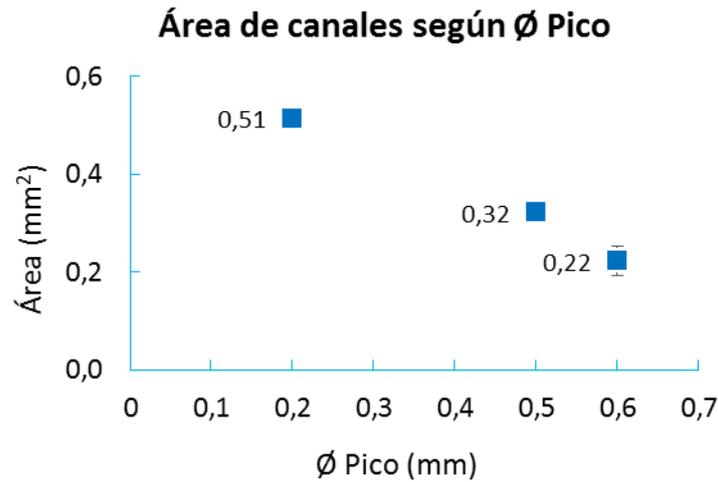


Figura 47: Área de los canales creados según el diámetro de pico utilizado. Para esta prueba se imprimieron probetas de PHBV con 50 % de relleno y el resto de los parámetros se mantuvieron iguales en todos los casos.

Se puede observar que el área de los canales generados tiende a disminuir a medida que el pico de extrusión aumenta. Esto es esperable: ante similares condiciones de impresión, si aumenta la cantidad de material extruido al usar una boquilla de mayor diámetro, quedará más espacio ocupado por el material y menos espacio vacío.

Por su parte, la Figura 48 ilustra la relación entre el área de los canales y el porcentaje de relleno.

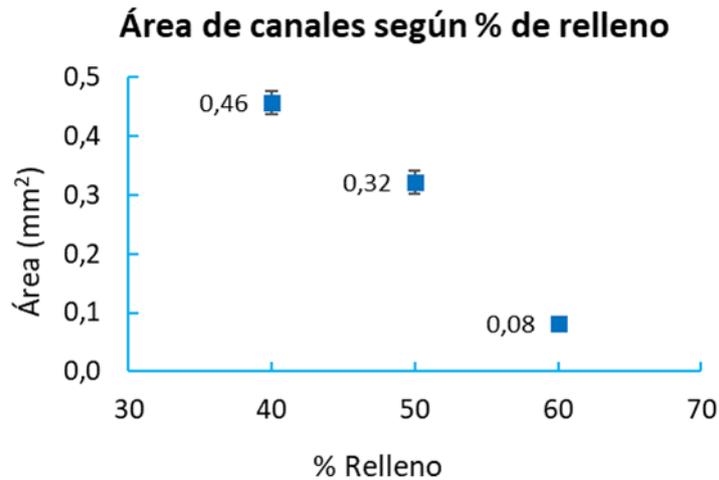


Figura 48: Área de los canales según el porcentaje de relleno utilizado. Para esta prueba se imprimieron probetas de PHBV con un pico de 0,5 mm y el resto de los parámetros se mantuvieron iguales en todos los casos.

En el gráfico presentado se puede observar que disminuye el área de los canales a medida que se aumenta el % de relleno. Esto se explica por el aumento en la cantidad de material extruido para cubrir una misma capa: al aumentar el porcentaje de relleno se imprimen más líneas por unidad de área, dejando menos espacios vacíos.

4.6.2.2 Ancho de línea impresa

La Figura 49 ilustra la relación entre el ancho de línea impresa y el diámetro de pico usado para la impresión.

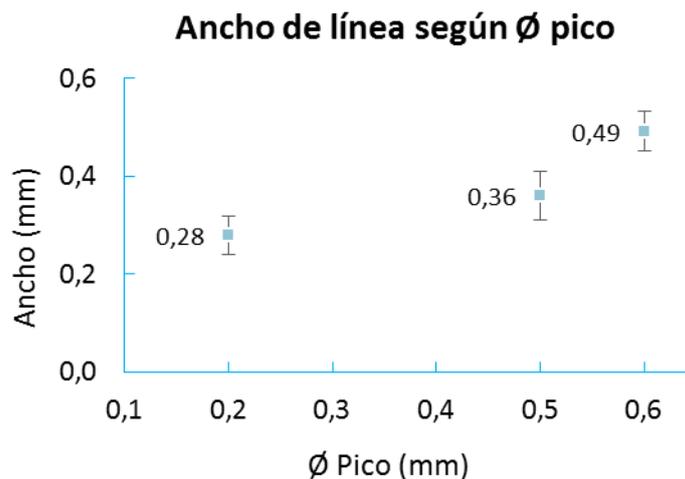


Figura 49 Ancho de línea según pico utilizado. Para esta prueba se imprimieron probetas de PHBV con 50 % de relleno y el resto de los parámetros se mantuvieron iguales en todos los casos.

Naturalmente se observa un aumento en el ancho del filamento al utilizar picos de mayor diámetro. Asimismo se observa que en el caso del pico de 0,2 mm las líneas impresas fueron más anchas que ese diámetro. Por el contrario, para los picos de 0,5 y 0,6 mm se observaron líneas más delgadas. Esto se da porque la impresión depende de muchos otros parámetros. Slic3r permite manipular configuraciones avanzadas de impresión que inciden directamente en el ancho de línea impresa. La altura de capa, la velocidad y la temperatura son los más relevantes.

4.6.3 Canales Horizontales

A continuación, se presentan algunas figuras que manifiestan cualitativamente cómo afecta el cambio del pico de la impresora a la altura de capa y la formación de los canales horizontales. Dada la insuficiencia de datos estadísticos y la falta de homogeneidad observada en las imágenes SEM, no se pudo realizar un análisis cuantitativo.

Se observó cómo difiere en los picos de mayor diámetro la altura real de la línea impresa respecto al valor establecido por diseño. Esto afecta directamente la altura de capa real observada.

En la Figura 50 se muestra un corte transversal de una pieza fabricada con pico de 0,2 mm.

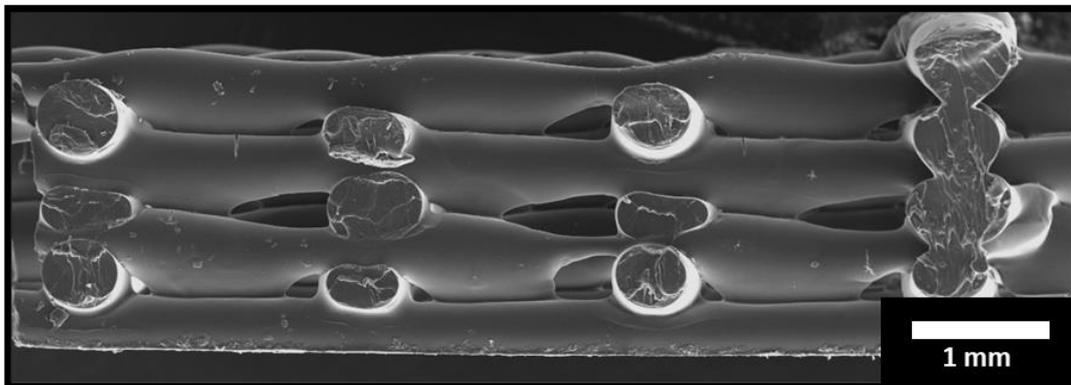


Figura 50 Imagen transversal obtenida por microscopía electrónica de barrido de un impreso fabricado con pico 0,2 mm.

La Figura 51 muestra una pieza impresa con pico 0,5 mm.

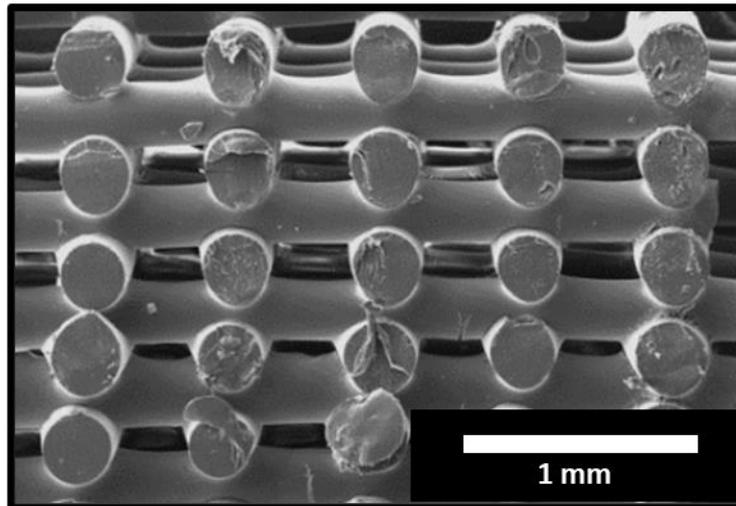


Figura 51 Imagen transversal obtenida por microscopía electrónica de barrido de un impreso fabricado con pico 0,5 mm.

La Figura 52 muestra una pieza impresa con pico de 0,6 mm. Se observa además en esta figura el uso del proceso de binarización de las imágenes para medir la distancia entre capas.

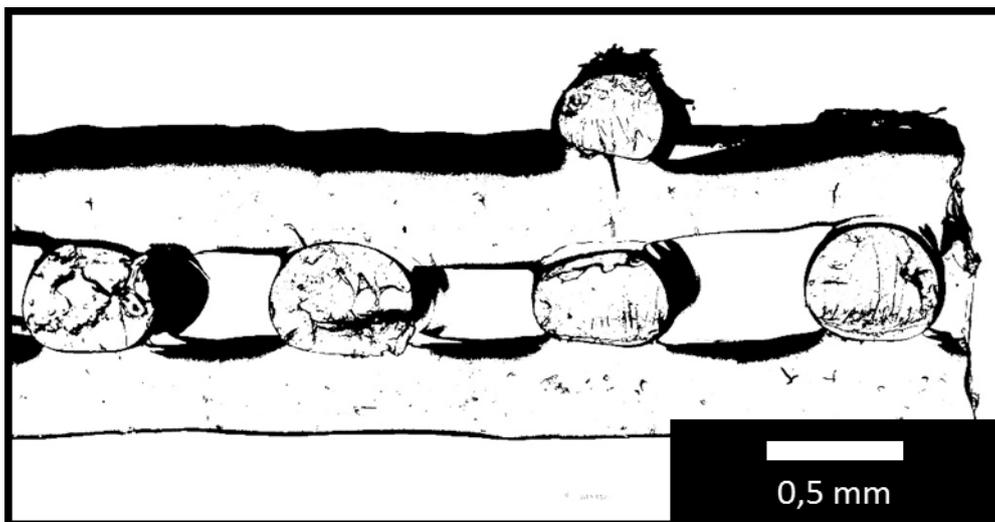


Figura 52 Imagen transversal de un impreso fabricado con pico 0,6 mm obtenida por microscopía electrónica de barrido y binarizada a través del software ImageJ

Se observa en las imágenes SEM que la altura entre capas varía según los parámetros de diseño. Esto implica una alteración de los espacios en los cuales se pueden depositar las células del tejido a regenerar.

4.7 Tratamiento superficial con BG sobre impresos 3D

En la Figura 53 se muestra la superficie de un andamio tras el recubrimiento con BG.

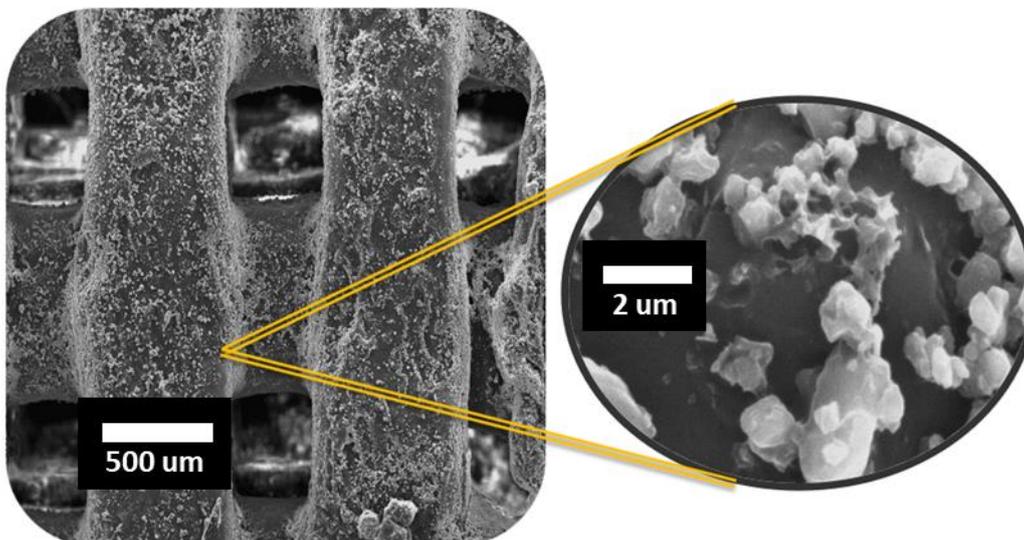


Figura 53 Imagen SEM de un andamio tratado superficialmente con BG. Se observa al andamio recubierto con partículas de BG (color blanco). Se incluye una segunda micrografía con mayor aumento para observar el anclaje de las partículas de BG a la matriz polimérica.

En la figura se observa la presencia del BG a lo largo de toda la superficie de los andamios, incluso en los canales internos. Además, se detectó experimentalmente que el nivel de adhesión es dependiente del tiempo de espera entre la impresión y la realización del tratamiento. El motivo por el cual esto sucede aún está en investigación. El empleo de BG tratado con CTMS para este ensayo sirvió para confirmar la biocompatibilidad del material en sistemas *in vitro*.

4.8 Ensayos mecánicos

Se presentan a continuación los resultados de los ensayos mecánicos.

4.8.1 Tracción

4.8.1.1 Tracción de filamentos

En la Figura 54 y la Tabla 5 se presentan las curvas de tracción y los resultados del comportamiento mecánico de los filamentos de PHBV y PHBV+BG(4%).

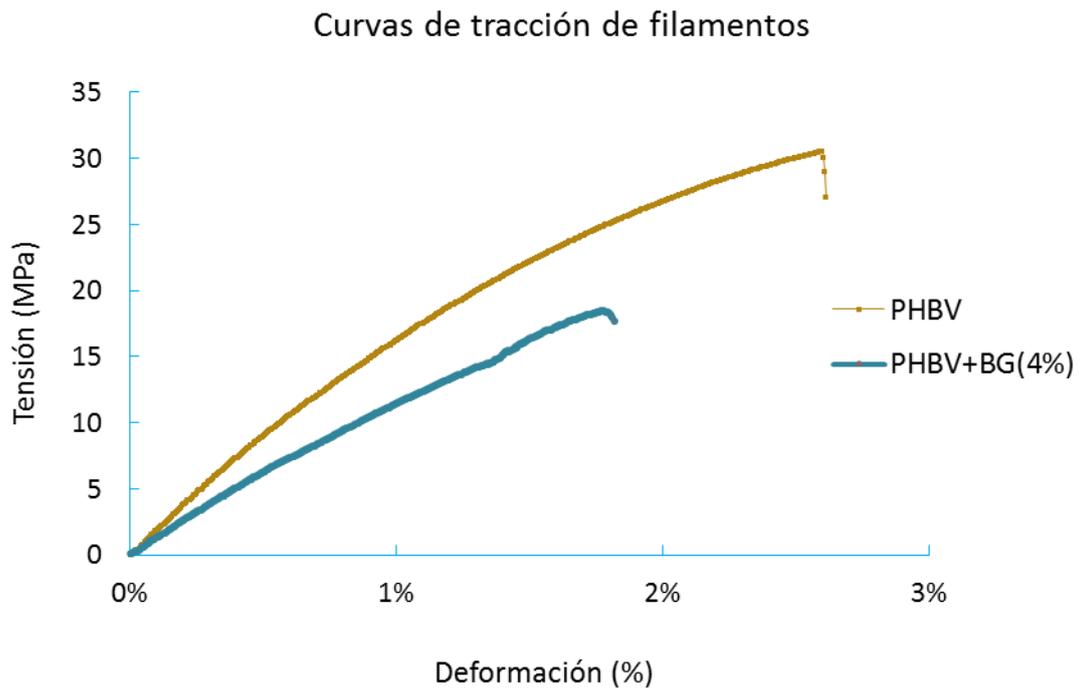


Figura 54: Curvas de tracción de filamentos con y sin BG

Tabla 5: Resultados tracción de filamentos

Material	E (GPa)	σ_r (MPa)	ϵ_r (%)
PHBV	1,6 ± 0,4	26 ± 5	2,6 ± 0,4
PHBV + BG 4 %	1,3 ± 0,4	19 ± 6	2,0 ± 0,5

Lo primero que se observa es el comportamiento elástico del polímero, con poca deformación plástica. La rotura se da al llegar al valor de tensión máxima. Además, se observa una ligera tendencia a la disminución del módulo tensil y la tensión máxima en el filamento de PHBV+B(4%), pero hay que tener en cuenta que los valores se encuentran dentro del desvío, por lo tanto, se puede entender que las propiedades no se ven seriamente modificadas por el agregado del BG al filamento. En cuanto a la deformación a la rotura, se observan valores similares al hueso compacto.

4.8.1.2 Tracción de Probetas con diferentes porcentajes de relleno

Se realizó una primera comparación entre probetas de PHBV impresas con el pico de 0,5 mm, con perímetros, capas externas (ver sección 3.5.2.1) y diferentes porcentajes de relleno. Además, se recubrió con BG a 2 probetas de 50 % de relleno, para analizar si esto modifica su comportamiento mecánico.

La Figura 55 muestra el comportamiento mecánico de cada tipo de pieza ensayada y en la Tabla 6 se resumen los valores de las propiedades analizadas.

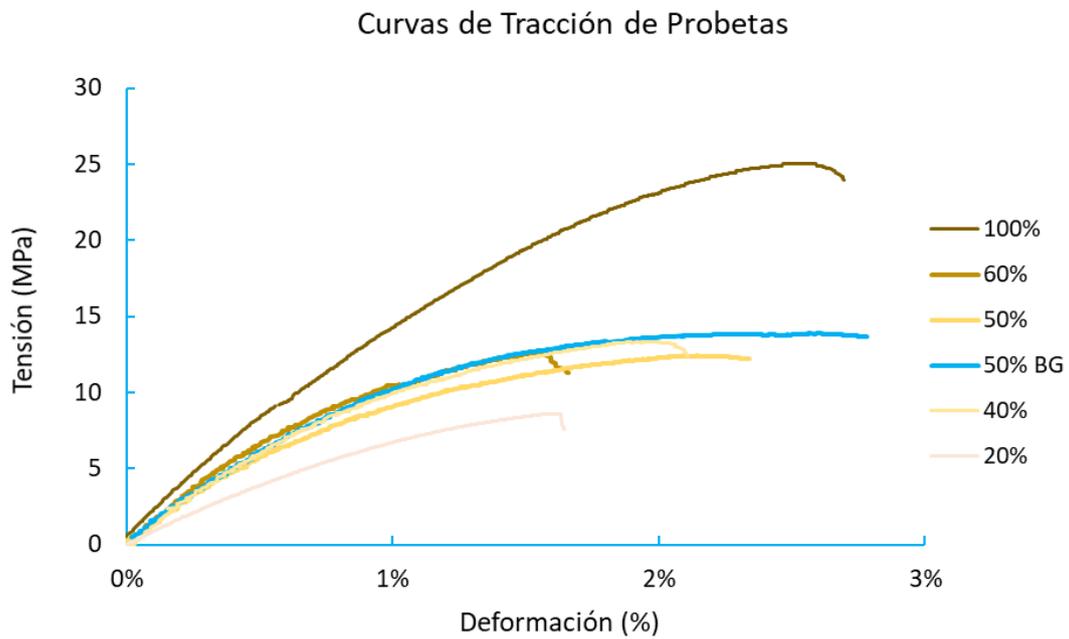


Figura 55: Ensayo de tracción de probetas de PHBV para diferente porcentaje de relleno y PHBV con BG superficial (50 % de relleno).

Tabla 6: Resultados de ensayos de tracción de probetas y comparación con filamento

Material y % Relleno	E (GPa)	σ_r (MPa)	ϵ_r (%)
<i>PHBV 20 %</i>	0,7 ± 0,1	10,6 ± 2,8	2,1 ± 0,6
<i>PHBV 40 %</i>	1,1 ± 0,2	14,9 ± 3,3	2,1 ± 0,4
<i>PHBV 50 %</i>	1,1 ± 0,1	13,3 ± 1,6	1,9 ± 0,5
<i>PHBV 50%+BG superficial</i>	1,1 ± 0,1	15,0 ± 3,0	3,0 ± 0,1
<i>PHBV 60 %</i>	1,2 ± 0,2	13,3 ± 2,9	2,1 ± 0,6
<i>PHBV 100 %</i>	1,8 ± 0,2	28,0 ± 3,0	3,0 ± 0,3
<i>Filamento PHBV</i>	1,6 ± 0,4	26,0 ± 5,0	2,6 ± 0,4

Cuando se trata de una pieza fabricada al 100 %, se puede presuponer que tendría valores similares a los del filamento impreso, dado que su sección transversal equivale al 100 % de relleno. Se verificaron valores de módulo tensil de 1,8 GPa y tensión máxima de 28 MPa, ambos muy similares a los medidos en los filamentos.

En las probetas de 40 % a 60 % de relleno, si bien se observan valores menores a las probetas de 100 %, no se observan diferencias significativas entre sí. Los módulos reportados son de ~1,1 GPa en todos los casos, incluyendo las probetas con BG superficial.

En el caso del agregado de partículas de BG de manera superficial, la diferencia observada en probetas de 50 % de relleno fue un leve aumento de la tensión máxima y la deformación a la rotura.

4.8.1.3 Tracción de probetas sin perímetros ni capas externas

Para este análisis se emplearon muestras de PHBV y PHBV+BG(4%) con un 50 % de relleno, impresas sin los perímetros ni las capas externas, ver 3.5.2.1. Este ensayo se realizó con el objetivo de caracterizar piezas que se asemejen a un andamio real.

La Figura 56 y la Tabla 7 presentan las curvas de tracción y los parámetros mecánicos más relevantes, respectivamente, de las piezas con y sin perímetros ni capas externas.

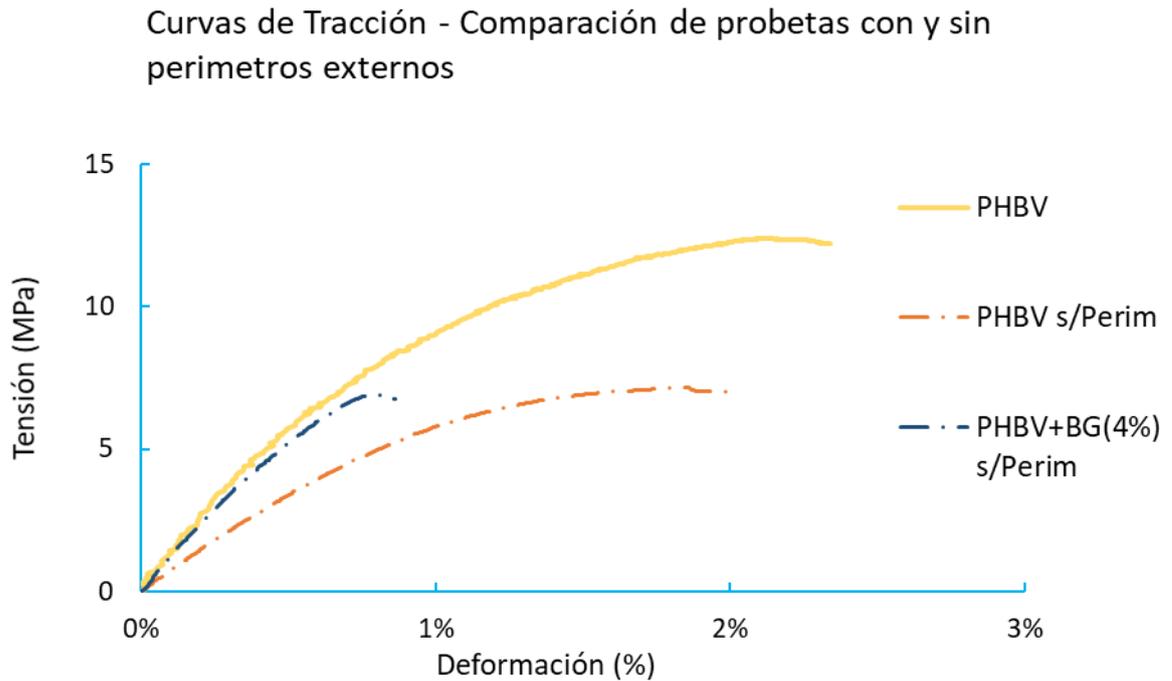


Figura 56: Curvas de tracción entre probetas impresas con y sin perímetros y capas externas (s/Perim).

Tabla 7 Resultados de probetas con y sin perímetros y capas externas

Tipo de Pieza	E (GPa)	σ_r (MPa)	ϵ_r (%)
<i>PHBV 50 %</i>	$1,1 \pm 0,1$	$13,3 \pm 1,6$	$1,9 \pm 0,5$
<i>PHBV 50 % sin perímetros ni capas externas</i>	$0,6 \pm 0,1$	$7,6 \pm 1,2$	$2,1 \pm 0,1$
<i>PHBV+BG(4%) 50 % sin perímetros ni capas externas</i>	$0,9 \pm 0,2$	6 ± 1	$0,8 \pm 0,1$

Las probetas de PHBV presentaron menor módulo tensil y tensión máxima al eliminar perímetros y capas externas. Las probetas de PHBV+BG(4%) presentaron módulo tensil levemente superior a las de PHBV, pero un descenso en la tensión máxima y deformación a la rotura.

No se pudo realizar una mayor cantidad de ensayos dada la poca disponibilidad de filamento. Resultó imposible imprimir probetas de PHBV+BG(4%) con capas exteriores con 100 % de relleno.

4.8.2 Compresión

Se presenta en la Figura 57 un gráfico representativo de los ensayos de compresión realizados con probetas de PHBV impresas con pico de 0,4 mm de diámetro y relleno de 40 %, 50 % y 60 %. Las curvas fueron graficadas hasta el 5 % de deformación para el cálculo del límite de proporcionalidad elástica, σ_e .

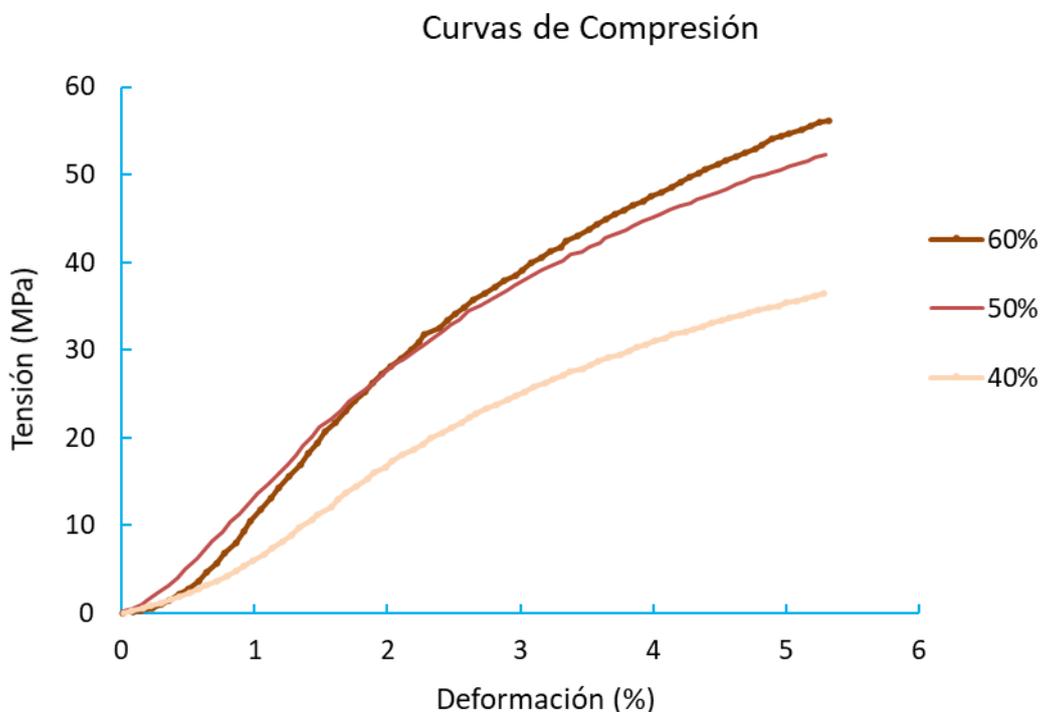


Figura 57: Ensayo de compresión de probetas de PHBV

En el gráfico se observa similitud en la pendiente inicial y el momento en el cual se produce la pérdida de linealidad de los tres tipos de probetas analizadas, siendo la probeta de 40 % la de menor módulo y tensión máxima.

Luego, se puede observar que se genera una segunda pendiente creciente, dada por el contacto entre las celdas de apoyo y carga. En esta última parte de la curva no se puede obtener información relevante, ya que se produce la deformación de la pieza (abarrilamiento).

A continuación, se presenta la Tabla 8 con los resultados del ensayo.

Tabla 8: Resultados de ensayos de compresión. [7],[58]

% Relleno	E_c (GPa)	σ_e (MPa)
40 %	0,9 ± 0,1	18 ± 4
50 %	1,2 ± 0,2	30 ± 6
60 %	1,3 ± 0,3	32 ± 6
Hueso Compacto	15 - 35	100 - 230
Hueso Esponjoso	0,05 - 0,5	2 - 12

Se observa en la Tabla 8 que los valores del límite de elasticidad, σ_e , son levemente superiores a lo observado para hueso esponjoso. Por otro lado, se observa una ligera tendencia al aumento del módulo de elasticidad en compresión al aumentar el porcentaje de relleno, sin embargo, los valores son muy similares teniendo en cuenta el desvío. De este modo, se presenta algo similar a los ensayos en tracción.

4.8.3 Otros ensayos mecánicos

La Tabla 9 resume la respuesta de probetas de PHBV con 50 % de relleno sometidas a ensayos de flexión, fractura e impacto.

Tabla 9: Resultados de los ensayos indicados en la primera columna, para andamio de PHBV con 50% de relleno.

Ensayo	Parámetro	PHBV 50%	Hueso esponjoso*	Hueso cortical*
Flexión	E_f (GPa)	3,6 ± 0,4	**	3,9 – 5,5
	σ_f (MPa)	17,8 ± 2,6	10-20	100 – 280
	ε_f (%)	13 ± 2	5-7	1
Impacto Izod	Rimp2 (kJ/m²)	3,4 ± 0,5	**	6 – 24
Fractura	K_{Ic} (MPa . m ^{1/2})	0,7 ± 0,3	0,1 – 0,8	2 – 12
	W_f (kJ/m ²)	1,7 ± 0,5	**	**

*Los valores de referencia del hueso esponjoso y cortical fueron obtenidos de [7],[59]–[61][62].

** No se encontraron resultados en bibliografía

4.9 Actividad en medio fisiológico simulado

Tras sumergir las muestras por 30 días en medio biológico simulado, se observó la estructura típica estilo “coliflor” que forma la hidroxiapatita [63], [64], tal como se observa en la Figura 58.

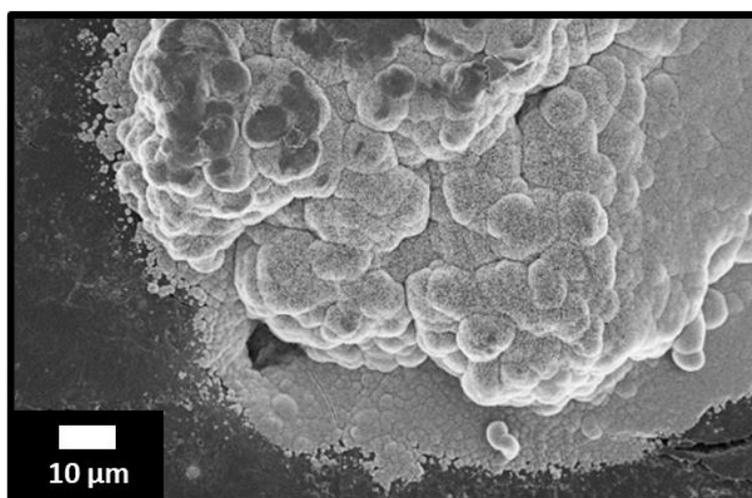


Figura 58: Formación de Hidroxiapatita sobre andamios de PHBV+B(4%) tras 30 días de inmersión en SBF.

En la Figura 59, se observa la misma estructura formada en grietas presentes en el andamio tras el período de inmersión, lo cual confirma la capacidad de formación de hidroxiapatita en el interior de la estructura fabricada con el filamento de PHBV+BG(4%).

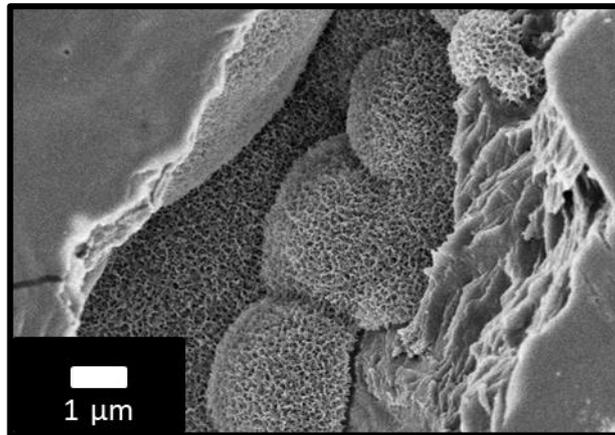


Figura 59: Formación de Hidroxiapatita en las grietas formadas en el andamio de la Figura 61.

4.10 Protocolo software .DICOM a .STL

A continuación, se presentan capturas de pantalla del procesamiento de imágenes DICOM.

En la Figura 60 se observa una imagen tomográfica del torso de una persona en el Slicer 3D.

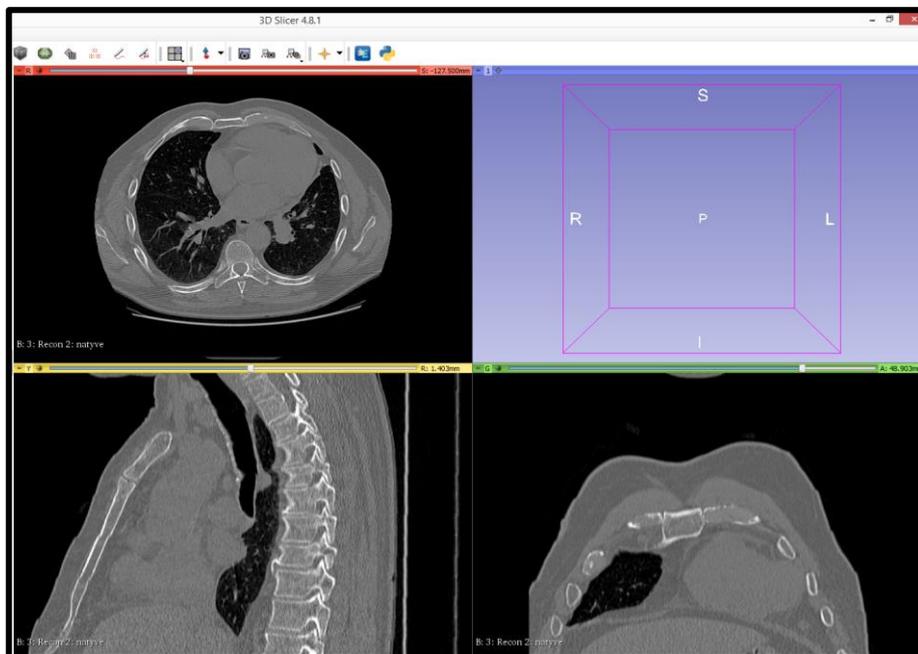


Figura 60: Captura de pantalla de la imagen tomográfica del torso de una persona en el Slicer 3D.

En la Figura 61 se observa la selección de la región de interés; en este caso se trabajó con un esternón.

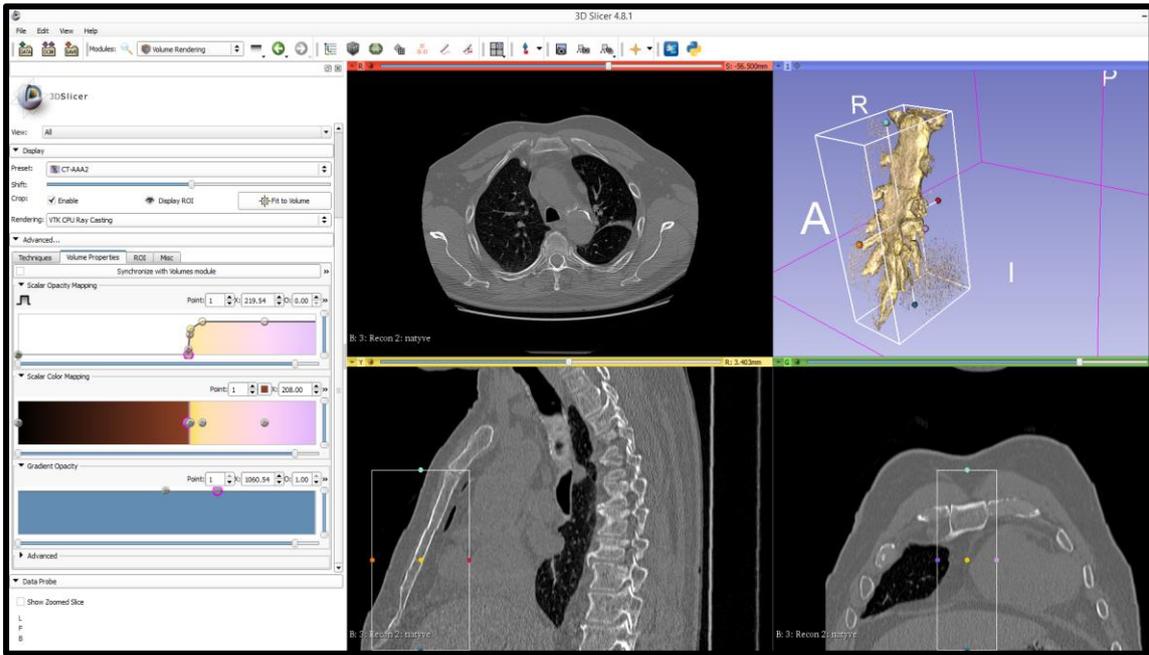


Figura 61: Selección de Región de Interés y representación del volumen óseo (esternón).

La Figura 62 muestra la representación del volumen y el comienzo de la segmentación. En esta parte del proceso, la selección del objeto tridimensional es optimizada con las herramientas de segmentación descritas en 3.10.

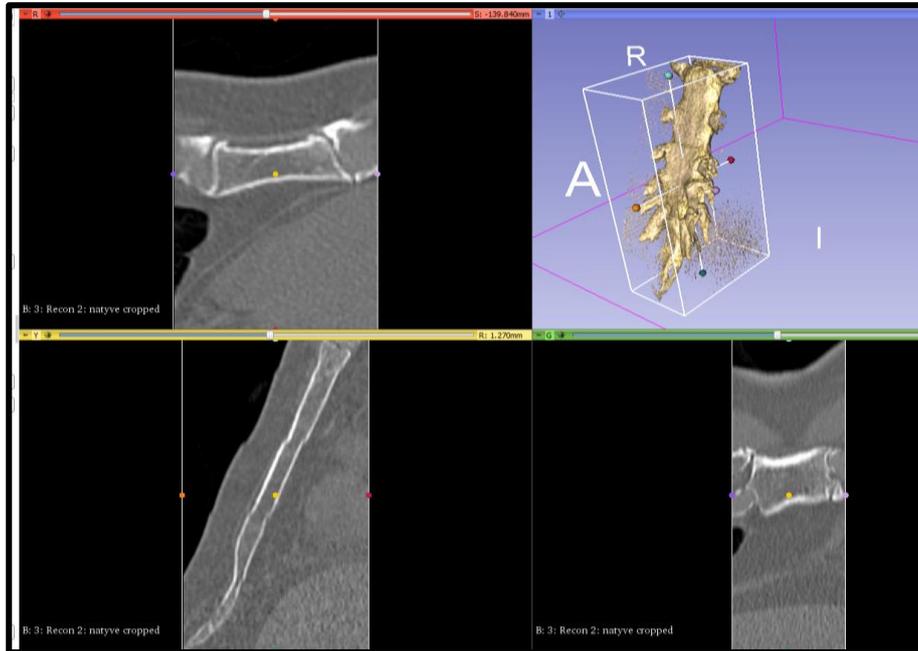


Figura 62: Segmentación primaria de la región de interés

Por su parte, la Figura 63 ilustra el uso de la técnica manual de segmentación.

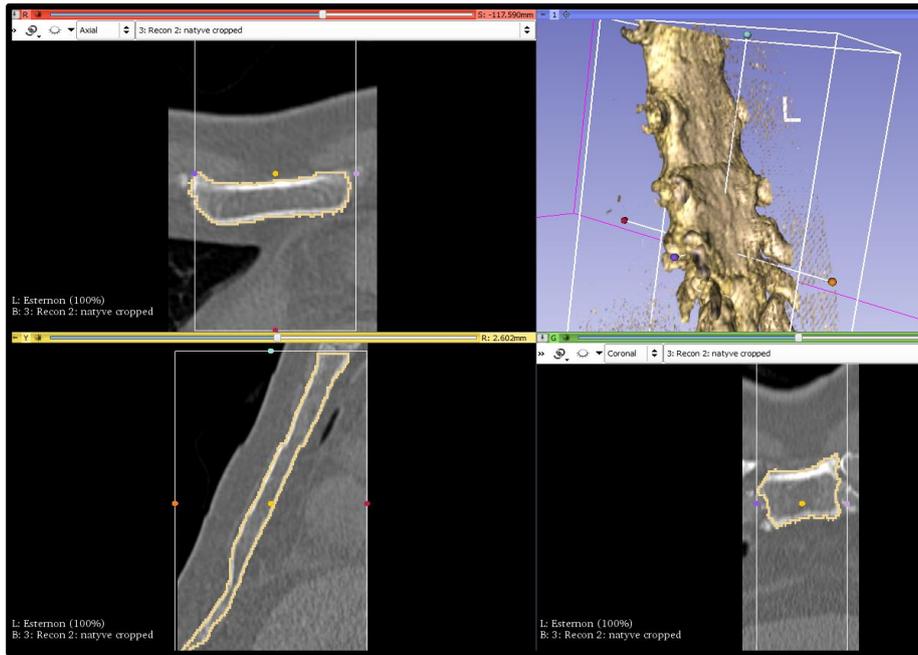


Figura 63: Segmentación específica del volumen a representar.

Tras segmentar el objeto, se observa en la Figura 64 como fue limpiada la imagen de aquellos bordes irregulares y puntos indeseables. Además, se muestra un solapamiento realizado con 2 planos de las imágenes tomográficas, para verificar que la segmentación se haya hecho correctamente.

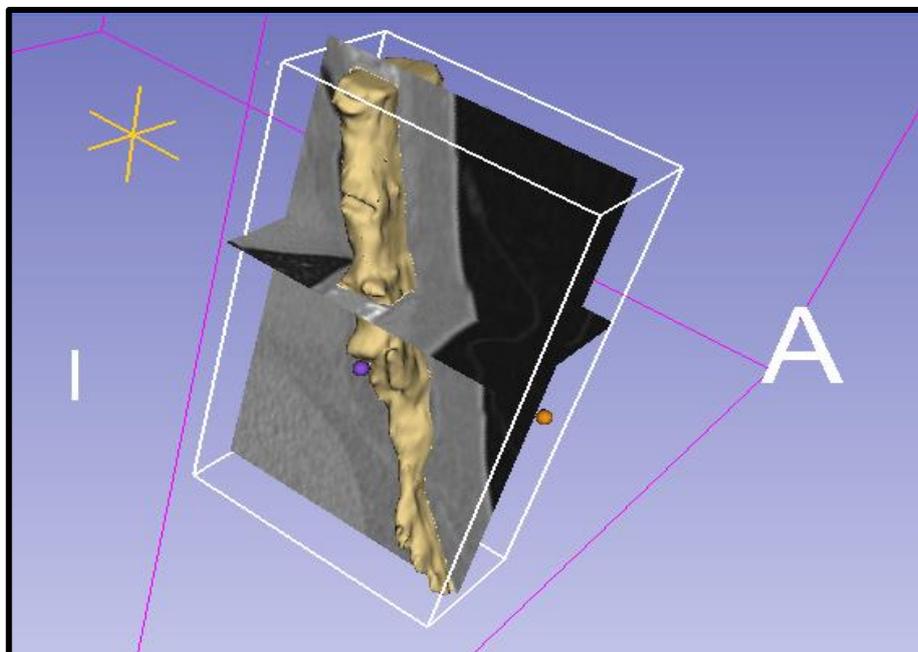


Figura 64: Esternón representado y solapamiento con planos de la reconstrucción tomográfica.

Una vez finalizada la segmentación y obtenido el archivo con el objeto tridimensional, fue almacenado en formato .STL y procesado con el MeshMixer. Con este programa se corrigieron errores de procesamiento previo, tal como se ilustra en la Figura 65.

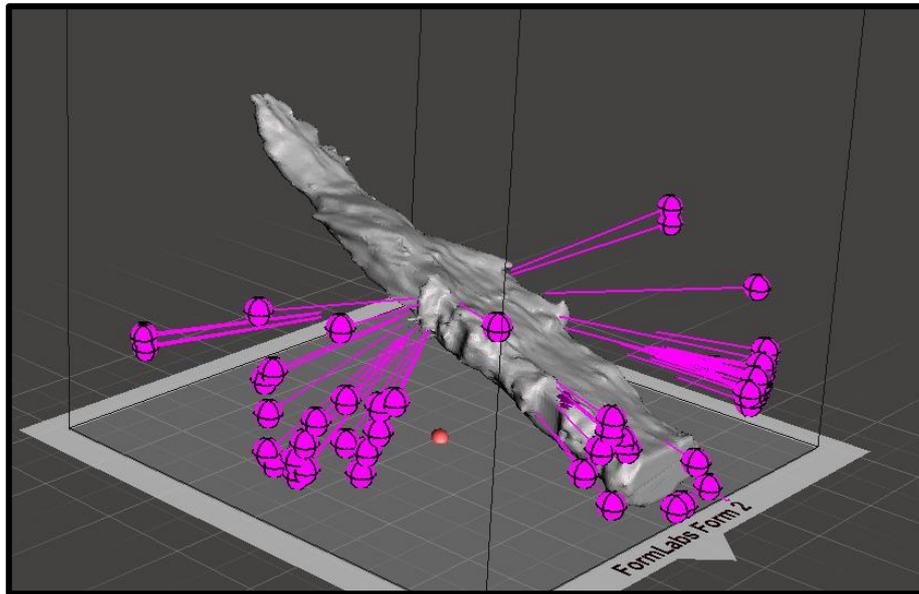


Figura 65: Esternón siendo procesado en MeshMixer

Una vez corregidos los errores, se importó el archivo en el Slic3r, programa donde se realiza la definición de parámetros y seccionamiento para imprimir la pieza. Se presenta la Figura 66.

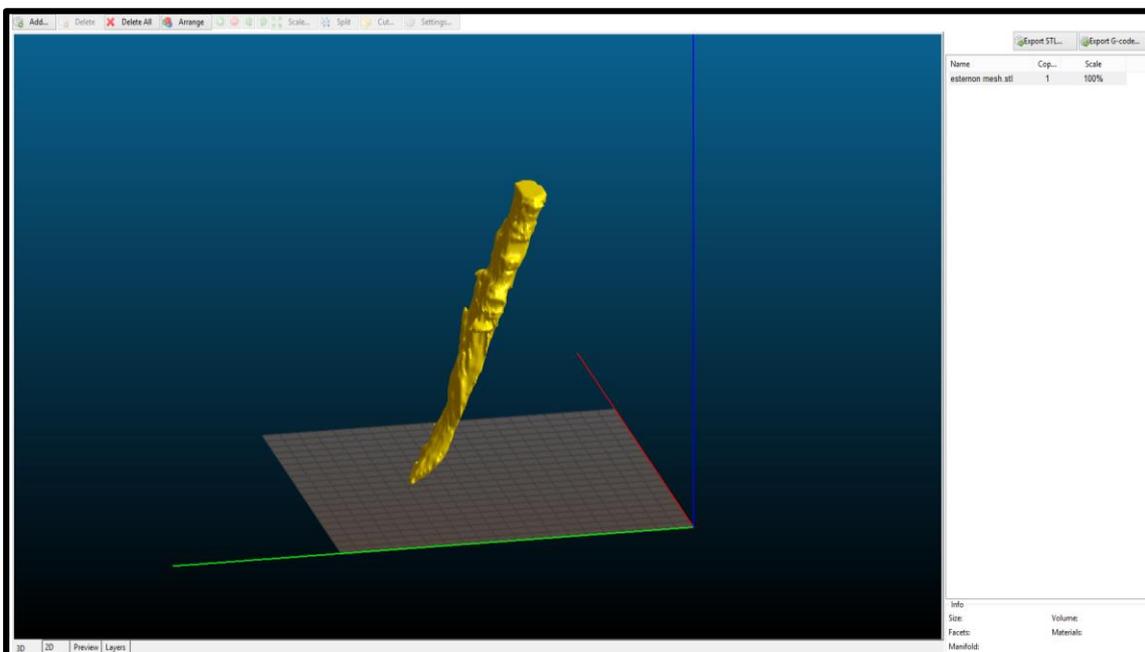


Figura 66 Selección de parámetros de impresión con el Slic3r

Una vez finalizado el protocolo, es posible la impresión 3D de los objetos diseñados. En el presente trabajo se realizaron impresiones de prueba para replicar algunos huesos con PHBV,

pero dada la dificultad de impresión con dicho polímero, no pudo lograrse una resolución satisfactoria. Por este mismo motivo tampoco se intentó imprimir con PHBV+BG(4%).

5. Estudio Normativo

Se toma como eje de este estudio a la guía de recomendaciones de la FDA y a una serie de documentos publicados por ANMAT, elaborados a partir de consideraciones internacionales para diseñar una futura regulación sobre productos hechos a medida del paciente [36], [37].

En este capítulo se muestran las exigencias normativas establecidas y en los anexos se presenta su grado de cumplimiento en los diferentes procesos llevados a cabo a lo largo del proyecto.

Introducción

ANMAT define un Sistema de Producción de Producto Médico (SPPM) como el conjunto de materias primas, programas, archivos digitales y equipamiento principal de producción y post proceso (si aplica) destinado a producir un tipo específico de producto médico en el punto de atención. El SPPM puede ser utilizado por parte de un efector de salud o un centro médico. El punto de atención puede ser un quirófano o un sector destinado específicamente a la producción de impresos tridimensionales. Además, ANMAT recomienda particularmente la participación de un tercero para controlar el proceso de fabricación. Antes de profundizar en aspectos técnicos de la fabricación, se recuerda que todos estos detalles deberán estar plasmados en la certificación del producto, y en el sistema de gestión de calidad de la empresa fabricante, según su pertinencia.

Las consideraciones más generales demandan un diagrama de flujo que explique el proceso productivo en su totalidad. Es de vital importancia identificar claramente cada paso en el proceso de producción para guiar los planes de verificación y aseguramiento de la calidad del producto final. Cuanto más descriptos estén los procesos, teniendo en cuenta los parámetros y las salidas de estos, más fácil será identificar errores y asegurar la calidad.

Es necesario el conocimiento de las capacidades y limitaciones del equipamiento y material utilizados, incluyendo rango de tamaños y geometrías posibles, opciones de configuración, entre otros. Se recomienda también el análisis de riesgos de todos los procesos, con sus respectivas mitigaciones.

Cuestiones Técnicas

Todas las normativas estudiadas recomiendan documentar la resolución espacial que permite el proceso productivo y la tolerancia que acepta el producto final para garantizar la calidad del producto final. Esto será definido según cada caso particular, y debe tener en cuenta: el modelado digital de piezas, la transformación y el procesamiento de imágenes .DICOM a objetos

digitales en 3D, el tipo de impresora utilizada y los materiales que componen a la misma, el nivel de limpieza y esterilización de las herramientas de fabricación, la resolución de las imágenes obtenidas y de la impresora, el material utilizado, post procesamiento, entre otros.

A la hora de analizar la calidad del producto final hay que tener en cuenta que dos equipos de manufactura aditiva de igual marca y modelo, probablemente posean cierta variabilidad. Esto se debe, por un lado, a los cambios que puedan surgir en las partes mecánicas de los equipos, que requieren mantenimiento y calibraciones permanentes. Por otro lado, puede haber cambios tanto en el hardware como en el firmware. Lo importante de este punto es realizar estudios pertinentes para definir aquellos parámetros que tengan mayor impacto en el proceso y/o producto final.

En la guía de recomendaciones de ANMAT se habla de *productos adaptados al paciente*. A diferencia de los *productos estandarizados*, éstos pueden construirse sobre la base de un modelo de plantilla de tamaño estándar, que luego se adapta a la anatomía del paciente. Por otra parte, el procesamiento de imágenes tomográficas y la técnica de manufactura aditiva permiten también la replicación de estructuras anatómicas complejas, por lo tanto, se puede hablar de otro tipo de producto llamado *a medida*, dado que presenta una solución diferente para cada paciente, ya sea replicando sus estructuras anatómicas o generando un diseño basado en ellas.

Cabe destacar que todos los procesos están sujetos a reconsideración en caso de encontrar problemas tanto en la evaluación del dispositivo final como en los procesos productivos.

Adquisición y procesamiento de Imágenes

Tiene que haber un control y cumplimiento de requerimientos mínimos en la adquisición y el procesamiento de imágenes, dado que no todas presentan la misma resolución y los procesamientos digitales pueden afectar la resolución del producto impreso. Cualquier procesamiento digital que pueda alterar las dimensiones o superficies del producto final debe ser controlado, la utilización de puntos anatómicos específicos como referencia espacial debe poder verificarse. Hay casos en los que el tiempo entre la adquisición de la imagen y la fabricación del andamio es un factor importante: en enfermedades progresivas existe una gran posibilidad que surjan cambios anatómicos que impliquen la necesidad de nuevos diseños. En cualquier caso, debe tenerse en cuenta el riesgo asociado a las consecuencias del procesamiento de las imágenes y considerar el peor escenario. Cualquiera sea el caso, la imagen original, el diseño final y los desvíos tolerables deben ser salvaguardados.

Formato de Archivos

Existen muchas empresas y organizaciones que ofrecen software tanto pago (Amira, Dornheim, Osirix, etc.) como libre (Slic3r, Meshmixer, 3D Slicer) para manipular las diferentes etapas del procesamiento de la imagen. Cada programa utilizado puede estar hecho con diferentes protocolos de lectura de la información, y la conversión de esos formatos de archivos puede afectar la morfología del producto final. Para reducir los efectos negativos de la conversión de la imagen, se recomienda por un lado definir un único protocolo, y por otro lado salvaguardar el archivo en un formato estandarizado (como ser .AMF o similar) para poder recurrir al mismo en caso de ser necesario.

Protección de la identidad del paciente

Es sustancial el correcto manejo de los datos de los pacientes. Hoy en día existen plataformas online que permiten obtener objetos .STL a partir de imágenes .DICOM, pero no garantizan la seguridad de dichos archivos. Para evitar la divulgación de información privada de los pacientes -Ley 26529-, es necesario tener un protocolo para obtener de manera segura los objetos tridimensionales basados en la anatomía del paciente.

Parámetros de impresión

Dependiendo del programa y la impresora utilizada, existe la posibilidad de modificar decenas de parámetros que afectan al producto final. La guía de la FDA recomienda estudiar aquellos parámetros que resulten claves para garantizar la calidad del producto final. Cada equipo es diferente y cada uno puede modificarlo a su criterio, por lo tanto, la ponderación de los diversos parámetros depende de cada fabricante y la experiencia que haya obtenido a través del tiempo.

En las guías internacionales se habla de definir y documentar toda la información que determina el desempeño del producto final, por ejemplo, condiciones ambientales, posición dentro de la base de impresión, agregado de material de soporte, tamaños de piezas, cantidad de capas, altura entre capas, temperaturas de la base y del pico de extrusión, diámetro del pico de extrusión, porcentaje de relleno, trayectoria de impresión, etc.

Material

Los materiales utilizados son sometidos a diferentes cambios químicos y físicos, es de vital importancia definir cuánto afecta esto al producto final.

Todo lo que ocurra con el material debe ser documentado y estudiado para garantizar la calidad del producto fabricado. Se requiere lo siguiente:

- *Identificar al material*: Nombre genérico, proveedor, especificaciones relevantes, certificados de calidad, etc.
- *Estudiar al material*: Según sea necesario, debe hacerse el estudio de las características que se puedan considerar relevantes para la fabricación de dispositivos médicos que se adapten al paciente; esto abarca propiedades químicas, físicas, biológicas, etc.
- Analizar las propiedades relevantes del material a través de los diferentes procesos a los cuales es sometido y los cambios que éstos puedan generarle.
- Definir propiedades del filamento a utilizar y las tolerancias admitidas, por ejemplo diámetro, punto de fusión, flexibilidad.
- Si el material es un *polímero*: composición, pureza, contenido de agua, fórmula molecular, estructura química, peso molecular, envejecimiento, temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión y cristalización.
- Si el material es *cerámico*: composición química y pureza.
- Si es un material *compuesto*: relación de composición.
- Biocompatibilidad (ISO-10993)

Post Procesamiento

Los productos suelen ser sometidos a procesamientos posteriores a su impresión. Por ejemplo, eliminación de rebabas o excedente de material, realización de tratamientos superficiales para modificar su rugosidad o para agregar algún material, esterilización, etc. Todo aquello que se realice posteriormente a la impresión debe estar documentado y todos los cambios que estos procesamientos le generen al producto final deben determinarse. Particularmente se exige la esterilización y el estudio de biocompatibilidad con la normativa internacional ISO 10993.

Etiquetado y Declaraciones de Entrega del Producto

Entre los documentos para un SPPM se recomienda la entrega de una declaración que permita identificar fabricante, producto y paciente, la orden escrita que dio lugar a la fabricación, mencionar el uso pretendido y especificaciones, la fecha de expiración y el número de versión utilizado. Toda información relevante debe estar asociada a la entrega del producto.

Conservación de la información

ANMAT recomienda el almacenamiento de todo el proceso de fabricación y documentación asociada durante un período mínimo de 15 años para productos implantables a medida.

Validación

Todo aquello que pueda afectar el rendimiento del dispositivo debe ser tenido en cuenta, estudiado, controlado y documentado. Para ello deben utilizarse las normativas y/o estándares que aplican a los diferentes procesos o características que se tengan como objetivo.

Todos los cambios que se realicen en las distintas etapas del proceso o acciones correctivas de productos implantados deben ser documentados y revalidados.

Consideraciones de Evaluación del dispositivo

La guía de la FDA recomienda describir al producto final de la manera más completa posible.

- Rango de dimensiones de trabajo
- Alteraciones por diseño
- Procesos a los cuales es sometido
- Porosidad
- Propiedades mecánicas
- Posición de impresión y orientación (anisotropía)
- Parámetros de impresión
- Post procesamiento
- Geometría y dimensiones
- Desempeño clínico

Aceptación

Los criterios y métodos de aceptación se sitúan dentro del proceso integral de control del dispositivo final. Para asegurar la repetitividad del producto final pueden realizarse técnicas de evaluación no destructivas, que van desde mediciones geométricas hasta rayos X.

6. Discusión

Se ha realizado el diseño, fabricación y caracterización de andamios reabsorbibles que podrían emular temporalmente características del tejido óseo y estimular los mecanismos de osificación. Esto implicó la selección de materiales, el diseño de los procesos de fabricación, el uso de la impresión 3D como técnica de fabricación de piezas a medida del paciente y el estudio de características relevantes de los andamios fabricados.

En este trabajo se ha utilizado la técnica de impresión 3D para la fabricación de piezas compuestas de polímero biodegradable y material inorgánico bioactivo. Se ha explorado dicha técnica y se ha definido un proceso ordenado de fabricación, logrando imprimir piezas con distintas morfologías y características. A continuación, se detallará el grado de cumplimiento de los objetivos planteados para el presente proyecto, se compararán los resultados con los de otros autores, se interpretarán los resultados obtenidos, y se manifestarán oportunidades de mejora de las distintas etapas del proceso de fabricación en base a lo trabajado en este proyecto.

La extrusión de filamentos de PHBV y PHBV+BG(4%) ha sido el primer logro del proyecto, dado que fue un punto de partida para la fabricación de andamios con la técnica de impresión 3D. Otros autores fabricaron filamentos compuestos de PHBV con otros materiales [13], [28], [29], o han intentado combinar PHBV con BG en andamios fabricados con técnicas alternativas a la impresión FDM, con resultados alentadores, [31], [65], pero se no encontró en bibliografía la conjunción del uso de dichos materiales y la técnica de fabricación. Probablemente se deba a lo siguiente: al extruir PHBV con BG se produce un filamento muy frágil, imposible de introducir en una impresora comercial. Los filamentos fabricados en el presente proyecto resultaron menos frágiles y de fácil manipulación, permitiendo ser introducidos en la impresora con la que se cuenta en el Lab3Bio, CODEX 2020. El filamento resultó más flexible gracias al tratamiento previo del BG con CTMS, aunque el efecto de dicho tratamiento está aún en proceso de investigación. El tratamiento por silanización se realiza para mejorar la interacción superficial entre el PHBV y BG, y además se producen cristales de NaCl; la conjunción de estos efectos podría ser la explicación.

Se pudieron establecer los parámetros de extrusión del equipo y las condiciones ambientales, logrando buena repetitividad en las propiedades de los filamentos elaborados. Para establecer el perfil de temperaturas de la extrusora se utilizó el resultado del análisis termogravimétrico. Éste indicó que el polímero comienza a degradarse a los 210 °C. Este dato fue utilizado para configurar la temperatura máxima de trabajo del proceso de extrusión en 190°C. El proceso de

solidificación del polímero al salir de la boquilla de extrusión es lento. Para lograr un producto final homogéneo se debe garantizar la estabilidad de la temperatura ambiente, por eso se trabajó en un área con temperatura controlada en 24 °C. Además, se ha visto que el diámetro final del filamento es altamente dependiente del manejo del operario, quien tiene que cargar continuamente la extrusora con los materiales. La frecuencia y la cantidad de material introducido en la extrusora son factores decisivos en el resultado final, por lo tanto, se observa una oportunidad de mejora del proceso. Se podría fabricar o adquirir una herramienta mecánica que automatice la entrada de materiales a la extrusora de manera precisa y a una frecuencia constante. El problema mencionado anteriormente afecta también la elección de la distancia existente entre la extrusora y la máquina que enrolla el filamento y la velocidad con la que dicha máquina enrolla el material. Por lo tanto, se espera que, solucionando el problema de la alimentación de la extrusora, se establezca de manera definitiva la distancia y velocidad de enrollamiento. Para continuar con la investigación, se realizó un filamento con contenido de BG 8 % m/m que resultó de fácil manipulación. Esto implicaría la fabricación de andamios con mayor cantidad de material bioactivo, aumentando la capacidad de regeneración tisular [65], [66]. Queda pendiente el estudio de las propiedades de dicho filamento.

Como era de esperarse, no fue tarea sencilla imprimir piezas con la impresora 3D con los materiales utilizados. Se trata de un material novedoso y nunca antes utilizado para impresión 3D por FDM. Experimentalmente el proceso es mucho más lento y las impresiones no son de la misma calidad que aquellas realizadas con plásticos comerciales. Sin embargo, se han podido realizar numerosas piezas con diferentes diseños con muy buena calidad de impresión.

Tras la investigación, se descubrió que los picos tradicionales de bronce que utilizan las impresoras comerciales se oxidan, se generan residuos de color verde (probablemente compuestos derivados del cobre) contaminando al polímero y dificultando las impresiones. Ante este problema, se utilizaron picos de acero inoxidable (el único ensayo exceptuado es el de compresión de cilindros de PHBV, dado que fue el primero y aún no contábamos con los picos de acero inoxidable), que no dejaron residuos, facilitaron el proceso de impresión y mejoraron la calidad de las piezas impresas. Los ensayos calorimétricos permitieron definir las temperaturas de trabajo de la impresora. En primer lugar, se observaron puntos de fusión de 172 °C a 182 °C, similares a lo visto en bibliografía, [22], [67]. En segundo lugar, estos valores confirmaron la factibilidad de realizar el proceso de impresión con impresoras de uso comercial, dado que pueden trabajar hasta ~240 °C. Para estandarizar el proceso, tras experimentar con diferentes configuraciones, se optó por configurar la temperatura de impresión en 200 °C, de modo que permita la fusión del material en el corto lapso que se encuentra dentro de la pieza

de fundición del filamento, a la vez que se encuentre 10 °C por debajo del límite de degradación. Se observó que el valor de temperatura necesario para fundir el material al usar el pico de acero inoxidable es mayor al que se requiere con el pico de bronce.

En comparación de los plásticos comerciales para uso recreativo o prototipado (ABS, PLA, etc.), el PHBV fluye lentamente a través del pico de extrusión y tarda más tiempo en solidificar una vez que se deposita en la base de impresión, lo que además genera una contracción pequeña pero observable del diámetro de las líneas impresas. Para asegurar la fidelidad de impresión y la adhesión entre capas, no se pudo superar en ningún caso los 15 mm/min; cuando se utilizan plásticos como el ABS, se suelen utilizar velocidades de 30 mm/min [47]. Dependiendo del tamaño de las piezas impresas, los tiempos de impresión empleados en el presente proyecto fueron entre 7 y 25 minutos.

Para la fabricación del producto final, el material se somete a dos procesos mecánicos y térmicos, la extrusión y la impresión. Dado que ambos procesos podrían afectar sus propiedades, se realizó el estudio calorimétrico (TGA y DSC). En el mismo se observó que la temperatura de fusión es estable a través de las distintas etapas, habiendo una diferencia de 10 °C entre valores mínimo y máximo reportados. En ese mismo estudio se detectó un doble pico de fusión en el PHBV+BG(4%). En bibliografía se han encontrado casos similares para PHBV combinado a otros materiales, atribuidos a inhomogeneidades en la cristalización del polímero [22], [67]. En los ensayos DSC se ha visto un grado de cristalinidad similar al de bibliografía en el polvo de PHBV puro y valores ubicados en un rango esperable para material en el resto de las etapas del proceso [67]. Otros autores han demostrado que el grado de cristalinidad afecta los tiempos de degradación del polímero [68], por lo que sería interesante realizar estudios *in vitro* en el laboratorio para observar y correlacionar este fenómeno a los ensayos recién mencionados. Asimismo, queda pendiente el análisis de la temperatura de transición vítrea para determinar si efectivamente se produce un corte de cadenas cuando el material permanece mucho tiempo a temperaturas cercanas a las de fusión. En correspondencia con esto, sería interesante realizar un estudio del peso molecular a través de las distintas etapas de fabricación [69].

Respecto a la morfología de las piezas impresas, se observó que el resultado final es variable según la complejidad del diseño. La impresión 3D es una técnica muy prometedora, que permite obtener piezas que respetan fielmente los diseños originales, pero no es la técnica perfecta. En el presente proyecto se fabricaron piezas de complejidad baja y media, de diferentes dimensiones, tramas y grados de curvatura, con resultados satisfactorios. Sin embargo, cuando las estructuras a replicar son de alta complejidad, como una vértebra, el proceso se dificulta

hasta el punto de no poder realizar la impresión. Por este motivo, la proyección a corto plazo debería orientarse a dar soluciones con morfologías simples y de dimensiones pequeñas.

El ensayo de fidelidad de las piezas impresas se realizó de manera manual con un calibre. En bibliografía se han encontrado otras metodologías de medición, que implican el escaneo tridimensional de las piezas impresas utilizando microtomografía y/o escáneres con tecnología láser, para la digitalización y comparación con el diseño original [70], [71]. Estos métodos brindan información más precisa acerca de la fidelidad de impresión, por lo tanto, se propone la posibilidad de mejorar este tipo de análisis a futuro. De todas maneras, el estudio realizado arrojó resultados positivos: se observó que la diferencia absoluta máxima entre la dimensión de una pieza real y el diseño impreso fue de 0,2 mm en una longitud de 50 mm, es decir, menor al 5 %. Además, se observó buena repetitividad, el desvío máximo reportado fue de 4 % en el espesor de las piezas para ensayos de impacto. Efectivamente el espesor de las piezas es el parámetro en el que se reportó mayor variabilidad, especialmente en los cilindros para ensayos de compresión, donde el tiempo de impresión de cada capa es corto y, por ende, se reduce el tiempo de secado del material una vez depositado, pudiendo afectar la adhesión de las capas subsiguientes. Se han visto resultados similares en bibliografía [72], sin embargo, dependerá de cada caso clínico el grado de fidelidad que requiera la pieza final. Además, hay que tener en cuenta que las piezas impresas pueden tener un acabado superficial para ajuste dimensional.

La evaluación morfológica de los canales internos reveló resultados satisfactorios. La técnica utilizada permite fabricar matrices “porosas” gracias a las tramas de diseño del programa, y tanto los tamaños como la orientación de los canales es manipulable. Con los resultados obtenidos se demostró que, modificando ciertos parámetros de impresión, como el porcentaje de relleno, la altura de capa o el diámetro del pico extrusor, el usuario puede determinar los tamaños de los canales horizontales y verticales. En el presente estudio se han observado canales internos de 0,08 mm² a 0,5 mm², los cuales permitirían dar lugar a la adhesión de células óseas, al mismo tiempo que permitirían la formación de tejidos de comunicación [19], [15]. El ancho de las líneas impresas fue otro parámetro observado, a mayor diámetro de pico utilizado, mayor es el ancho de la línea trazada. Sin embargo, se observó que el ancho del trazo no se corresponde de manera exacta con el diámetro del pico utilizado. Esto es así por la influencia de la altura de capa elegida y el tipo de material. Se ha visto en el proceso de impresión que el polímero presenta una transferencia de calor lenta, por lo tanto, tarda un tiempo considerable en solidificarse y finalmente se contrae. En todas las piezas impresas se utilizaron tramas perpendiculares entre cada capa (es decir, líneas rectas a 90° entre sí). Los programas de impresión permiten diseñar tramas diferentes, que darían lugar a estructuras más complejas

con porosidades variables, lo cual sería beneficioso para los andamios [13]. Durante la investigación se han intentado imprimir tramas más complejas, pero los resultados no han sido satisfactorios. Una tarea que excede al objetivo de este trabajo es establecer las condiciones de impresión que optimicen la impresión de tramas complejas con materiales como el PHBV [13], [28].

Las propiedades mecánicas de las estructuras fabricadas están directamente relacionadas con la porosidad. Previo a la interpretación se vuelve a aclarar que en las normas internacionales de caracterización mecánica se indica la utilización de probetas sin ningún tipo de “hueco”, lo cual difiere de las características buscadas para la aplicación real de estos andamios. Sin embargo, todos los autores encontrados en bibliografía que han explorado esta problemática han optado por seguir protocolos similares al de este trabajo, dado que no hay otro tipo de normativa vigente que detalle alternativas para este tipo de caracterización.

Lo primero que determinó fue la respuesta a la tracción de los filamentos. Este parámetro permite saber las propiedades del material y establece un límite superior al módulo tensil y la tensión máxima que podrían soportar los andamios. Se obtuvieron resultados esperables en el PHBV, $1,6 \pm 0,4$ GPa, y en el PHBV+BG(4%), $1,3 \pm 0,4$ GPa. Se vio que al agregar BG se reducen tanto el módulo (20 %) como la tensión máxima soportada (27 %).

El análisis mecánico más exhaustivo se realizó con las probetas de tracción, con perímetros externos, piso y techo. Utilizando un pico de 0,5 mm y con un porcentaje de relleno entre el 40 % y el 60 %, se observó que el orden de magnitud del módulo tensil de las probetas de PHBV es de aproximadamente 1 GPa y se mantiene constante, la tensión máxima fue cercana a 14 MPa, este resultado se sitúa en un rango similar al hueso esponjoso [7].

Retomando el ensayo morfológico, al analizar los canales verticales formados en piezas impresas con pico 0,5 mm se observaron canales de $0,46 \text{ mm}^2$ para 40 % de relleno y canales de $0,08 \text{ mm}^2$ para 60 % de relleno. Si bien se observó una tendencia, no se presentó una dependencia funcional entre porosidad y módulo tensil. Se han reportado resultados similares en ensayos con otros polímeros, como el PLA [51].

Pensando en las posibilidades de diseño, el hecho que las propiedades se mantengan estables en el rango de 40 % a 60 % permitiría controlar diferentes niveles de porosidad del andamio sin afectar el comportamiento mecánico. Fuera del rango mencionado (40 % - 60 % de relleno), el comportamiento mecánico sufrió modificaciones más evidentes. Las probetas de 20 % de relleno redujeron el módulo tensil a 0,7 GPa y la tensión máxima a 10 MPa (aprox. 30 % de reducción en ambos casos). Las probetas con un 100 % de relleno manifestaron valores similares

a los observados en el filamento, lo cual es esperable, puesto que la tensión se calcula en base al área transversal del elemento a medir. Agregar superficialmente el BG en probetas de 50 % de relleno no produjo modificaciones en el comportamiento mecánico del andamio, lo cual fue positivo dadas las propiedades que le confieren al mismo.

Se recuerda que las normas de ensayos mecánicos indican que las piezas a ensayar deben ser “lisas” por fuera, sin embargo, los andamios requieren la mayor conexión posible con el medio circundante para poder ejercer su rol como catalizador de la regeneración de tejido. Por este motivo, se realizaron ensayos con piezas que exponen los canales al exterior, es decir, sin capas externas, piso ni techo. Los resultados observados indicaron un detrimento en las propiedades mecánicas respecto de las piezas que tienen capas externas. En piezas de PHBV se observó una caída de 1,1 GPa a 0,6 GPa en el módulo tensil y de 13,3 MPa a 7,6 MPa en la tensión máxima. Por otra parte, las únicas piezas impresas con el filamento de PHBV+BG(4%) fueron de este tipo. El módulo tensil observado fue de 0,9 GPa y la tensión máxima 6 MPa. Se observó un aumento del módulo tensil respecto al PHBV, esto puede relacionarse con el método de fabricación y la variabilidad que puede llegar a presentar usando diferentes materiales. Hay que mencionar que previo a este ensayo, las únicas piezas impresas con PHBV+BG habían sido rectangulares o cilíndricas. Las piezas para el ensayo de tracción “hueso de perro”, que presentan mayor complejidad dada su curvatura, se imprimieron con una fidelidad muy alta, pero no se pudieron hacer numerosas repeticiones dada la cantidad de filamento disponible. Teniendo en cuenta las condiciones de impresión y las posibilidades de mejora, estos resultados son prometedores para la fabricación de andamios que pretendan imitar propiedades mecánicas de hueso esponjoso. Para lograr mimetizar las propiedades mecánicas del hueso compacto se requieren valores más elevados [7].

Luego, se observaron los resultados de los análisis de compresión del PHBV. En este caso el pico utilizado fue de 0,4 mm y de cobre. Los cilindros fueron impresos en la primera etapa del proyecto y aún no se contaba con los picos de acero inoxidable. Al no haber tenido oportunidad de realizar nuevos ensayos, se decidió incluirlos en el presente trabajo. El módulo en compresión para las probetas impresas en PHBV tuvo valores cercanos a 1 GPa, y se observaron tensiones máximas cercanas a 30 MPa. Además, se observa una tendencia que relaciona los porcentajes de relleno elegidos con el comportamiento mecánico del andamio. Los resultados reportados se aproximan al del hueso esponjoso (ver Tabla 8). Asimismo, se pueden comparar los resultados respecto a sustitutos óseos fabricados por otros autores. Se han visto módulos en compresión de 0,36 GPa en andamios de PHA-PLA fabricados con impresión 3D FDM [13], tensiones máximas en compresión de 62 MPa en cilindros fabricados por moldeado a presión de PHA-HA [30]. Otras

estructuras con mayores niveles de porosidad, más similares a una esponja, presentaron peores propiedades mecánicas. Se han visto tensiones máximas en compresión de 0,2 a 0,7 MPa en andamios de PHBV-CaP (Fosfato Cálcico) utilizando técnicas de sinterizado selectivo laser (SLS) [73], y de 0,1 a 0,2 MPa en constructos de PHBV-BG fabricados con técnicas de moldeado y *leaching* (con agentes porógenos).

Tras realizar el ensayo de flexión de barras rectangulares de PHBV con 50 % de relleno, se observaron propiedades comparables a las observadas en hueso esponjoso (Tabla 9). Por otra parte, se observó un significativo aumento del módulo tensil respecto al calculado en tracción. Esto fue verificado con ensayos de flexión de filamentos realizados en el DMA dentro del Lab3Bio. La causa de este comportamiento se encuentra aún en estudio, otros autores han observado comportamiento similar en otros polímeros y atribuyen esta diferencia a la orientación en la cual la tensión es recibida por el material [74], [75]. El ensayo de impacto demostró que, si bien la resistencia al impacto del impreso de PHBV es menor, éste se encuentra dentro del orden de magnitud del hueso compacto. No se han encontrado ensayos de impacto con hueso esponjoso. Respecto a los ensayos de fractura, el factor crítico de intensidad de tensiones de las probetas de PHBV se situó dentro del rango de valores exhibido en el hueso esponjoso, según lo reportado en bibliografía. En resumen, los ensayos complementarios realizados con los impresos confirman su potencial capacidad de emular el comportamiento mecánico del tejido.

Se observó la actividad en medio biológico simulado para confirmar la formación de una capa de hidroxiapatita en la superficie de los andamios, lo cual representaría un primer indicio de que el andamio es capaz de generar lazos de unión con el tejido óseo [56], [63], [64]. Se obtuvieron imágenes por microscopía electrónica de barrido, confirmando la formación de hidroxiapatita con estructuras típicas en gran parte de la superficie de los andamios y en el interior de grietas de andamios sometidos a inmersiones de mayor duración. Estudios de espectroscopía de difracción de rayos X realizados por investigadores del Lab3Bio confirman formación de hidroxiapatita.

La funcionalización de la superficie con BG aumenta la hidrofiliidad y rugosidad de los andamios. Esto se observa en la sección 4.7. El aumento de rugosidad es buscado para mejorar la adhesión celular [50]. Se aclara que otros métodos de funcionalización de superficies pueden ser utilizados para mejorar la adhesión celular, como el plasma de oxígeno [20], [21], que incrementan la hidrofiliidad pero no la rugosidad en la escala de los micrómetros. En el Lab3Bio se observaron en imágenes SEM cómo es el anclaje celular en las partículas de BG en la superficie de los andamios. Las células se adhieren específicamente a las partículas de BG. Los resultados

mencionados confirmaron ensayos estudiados en bibliografía. Si bien es necesario realizar un estudio *in vivo*, este es el primer paso para la confirmación de la capacidad osteoconductora de los andamios.

Queda pendiente evaluar cuantitativamente cuánto afecta el tiempo de almacenamiento al polímero, dado que se observó una gran diferencia a la hora de dar funcionalidad a la superficie con BG. Los andamios recubiertos el mismo día de su impresión presentaron dificultades para adherir el BG y mayor disolución al ser sumergidos en solvente. Aquellos andamios que tuvieron 2 semanas de almacenamiento entre el proceso de impresión y la funcionalización de su superficie fueron muy eficientes al adherir el BG, sin presentar deformaciones estructurales. Esto se explica por los tiempos de cristalización del polímero. En el primer caso, no se da tiempo al proceso de cristalización, por lo tanto la fase amorfa del polímero es mayor, lo que acentúa el efecto del solvente. En el segundo caso, tras dos semanas de almacenamiento se conserva mejor la estructura porque ocurren procesos de cristalización primaria y secundaria en el polímero. La inmersión en el solvente logra disolver solamente una capa externa, ablandando la superficie y anclando físicamente al BG.

Otra parte del proyecto estuvo dedicada a la generación de diseños tridimensionales a partir de tomografías computarizadas. Se han estudiado diferentes herramientas de programas para el procesamiento de imágenes .DICOM. Se ha trabajado con tomografías anónimas de pacientes para garantizar su protección. Los programas estudiados para convertir el archivo .DICOM a formato .STL presentan herramientas gráficas similares. El programa 3D Slicer fue el preferido para realizar la primera parte del proceso, dado que es gratuito, sencillo de utilizar, presentó resultados satisfactorios y representa la idiosincrasia detrás del concepto del uso de la impresión 3D, fomentando el programa de uso libre, gratuito y comunitario. Del mismo modo se utilizó el MeshMixer para perfeccionar y simplificar los diseños tridimensionales y el Slic3r para generar los archivos .gcode. En la sección 4.10 se pueden observar capturas de pantalla con la evolución del diseño de una pieza a través de las distintas etapas. En el presente proyecto se manifestó un protocolo ordenado de procesamiento y diseño. Sin embargo, éste puede variar según la necesidad de cada caso. Se recalca la importancia de saber el alcance y las limitaciones de esta tecnología y los errores asociados a su manipulación, para poder generar un planteo de requisitos y desviaciones permitidas según el objetivo buscado. Dentro de las limitaciones y los errores asociados al uso de técnicas de procesamiento de imágenes, se puede mencionar lo siguiente: El proceso es altamente dependiente de la experiencia y conocimiento anatómico del usuario. Segmentar los tejidos con el uso de umbrales conlleva errores de método asociados a la calidad de la imagen tomográfica, o a la similitud entre densidades de tejidos diferentes. Los

filtros utilizados para suavizar el diseño y permitir la impresión pueden afectar la fidelidad respecto a la imagen original, etc. [76], [77]. Incluso un estudio demostró la variabilidad que presenta el uso de esta técnica: tres instituciones con vasta experiencia en modelado tridimensional de estructuras anatómicas reconstruyeron un cráneo a partir de una imagen tomográfica, los archivos fueron almacenados en un mismo formato y luego fueron comparados, se observaron diferencias de volumen total, conteo de triángulos, y morfología [76].

Por otra parte, el registro de la información resulta sencillo dado que se pueden almacenar todos los archivos creados en el proceso de digitalización de las estructuras junto con los parámetros de impresión. El sistema de registro debería contener: la imagen .DICOM, el archivo del objeto tridimensional en formato .AMF (por recomendación de FDA) y .STL, el archivo con los parámetros de impresión, el .gcode y los formularios presentados en los anexos como información complementaria. Queda pendiente en el presente estudio la impresión de los objetos reconstruidos a través de las herramientas gráficas previamente mencionadas. Se intentó realizar la impresión de algunas estructuras anatómicas con PHBV, pero el resultado no fue satisfactorio. Por el momento, se podrían utilizar estos protocolos para seleccionar la dimensión de los andamios en base a puntos anatómicos de referencia.

Para garantizar la limpieza del producto final, la impresión debe ser realizada en un área limpia con control de partículas en el aire y los componentes que entren en contacto con el compuesto deben ser de acero inoxidable. Una vez fabricado el producto, debería ser empaquetado con doble envase y esterilizado para su almacenamiento o transporte previo al uso clínico. La limpieza debe ser muy efectiva, dada la porosidad que presentan los andamios. El polímero funde a temperaturas cercanas a 180 °C y el biovidrio absorbe rápidamente la humedad, por lo que se descartan métodos de esterilización con altas temperaturas [78]. Otros autores esterilizaron muestras de PHB con Hidroxiapatita en un horno a 121 °C en 1.5 horas sin afectar sus propiedades [79]. El óxido de etileno es un gas que se utiliza para esterilizar a bajas temperaturas; se probó en diferentes estudios con resultados prometedores. Sin embargo es necesario asegurar su eliminación completa antes de implantar. La irradiación gamma no afecta la resistencia a la tracción y la deformación a la rotura de constructos de PHBV [80]. En el Lab3Bio ya fue probado el método de esterilización por autoclave previo a la realización de los ensayos de adhesión celular con resultados positivos. Se han visto células adheridas al BG y no se han observado cambios en las dimensiones de estas. La esterilización de películas de PHBV por irradiación gamma también fue estudiada por investigadores del Lab3Bio, reportando resultados satisfactorios [81]. De todas maneras, es requisito normativo el estudio de las

propiedades del constructo post esterilizado para verificar que no hayan sido modificadas sus características mecánicas y de biocompatibilidad. En el empaque final debe adjuntarse toda la información relevante del constructo, citada en anexos normativos.

Se considera que se han analizado los aspectos más relevantes del proceso y el producto final dando cumplimiento a gran parte del marco normativo vigente. Se debe tener en cuenta que el presente trabajo forma parte de un proyecto de investigación en el ámbito académico dentro de un laboratorio. Sin embargo, se trabajó como si fuera el proyecto de un fabricante, teniendo en cuenta todas las consideraciones normativas que hacen a la calidad del producto final. Se generaron registros de las distintas etapas del proceso para que éste sea repetible, demostrable y mejorable, tal como se refleja en los anexos normativos. Quedan estudios pendientes que podrían resultar de interés para evaluar la función de los andamios: tiempos de degradación del compuesto tanto en condición de almacenamiento como en fluido simulado, ensayos mecánicos de fatiga para evaluar condiciones que se asemejen a las del uso en determinados sectores del cuerpo, ángulo de contacto para identificar cuantitativamente la hidrofiliidad superficial del compuesto, entre otros. Quedan planteadas las bases del proyecto para investigaciones futuras, haciendo hincapié en las oportunidades de mejora planteadas en las diferentes etapas del proceso, y de este modo promover el avance con el objetivo de lograr el estudio de aplicaciones clínicas de los constructos generados.

7. Conclusiones

Se cumplió el objetivo general del proyecto. Se han diseñado, fabricado y caracterizado andamios compuestos por un biopolímero y un cerámico bioactivo.

Se efectuó un extenso estudio de las características de los andamios, que incluye:

- 1- Composición
- 2- Morfología
- 3- Porosidad
- 4- Propiedades Mecánicas
- 5- Propiedades Calorimétricas
- 6- Propiedades de la superficie
- 7- Actividad en medio fisiológico simulado

Los resultados reportados a lo largo del presente trabajo demuestran que:

- Se ha podido fabricar tanto filamento como piezas de PHBV y BG
- El uso de la impresora 3D permite elaborar morfologías y porosidades variables con alto grado de fidelidad y reproducibilidad por la técnica de FDM
- Las propiedades mecánicas de los andamios se asemejan a las del hueso esponjoso
- Los procesos de fabricación y las temperaturas de trabajo permiten manipular los materiales sin sufrir consecuencias severas en su rendimiento o composición
- Los andamios presentan mucho potencial como elemento osteoconductor, al observar formación de hidroxiapatita en su superficie.

Además, se diseñó y caracterizó el proceso de fabricación, que incluye:

- 1- Diseño digital de piezas tridimensionales
- 2- Procesamiento digital de imágenes .DICOM
- 3- Fabricación de filamento
- 4- Impresión de piezas
- 5- Ejemplo de reporte de diseño y fabricación (Anexo)
- 6- Adecuación al marco normativo vigente

El estudio normativo y diseño de los procedimientos sienta las bases para futuras investigaciones y fabricaciones dentro del Lab3Bio.

Como oportunidades de mejora y/o continuación del proyecto, se menciona la posibilidad de:

- Mejorar el proceso de extrusión de filamento, automatizando la carga de material
- Mejorar el proceso de impresión (haciendo foco en los diversos factores que se han ido sugiriendo a lo largo de todo el proyecto)
- Profundizar el estudio de propiedades relevantes de los andamios, tales como hidrofiliidad con ensayos de ángulo de contacto, o ensayos de fatiga, por ejemplo.
- Intentar imprimir réplicas de huesos humanos a partir de imágenes anatómicas con PHBV y posteriormente con PHBV+BG(4%)
- Profundizar el protocolo .DICOM a .STL.
- Esterilizar piezas con distintos métodos y evaluar sus propiedades
- Profundizar el estudio normativo y el desarrollo de un sistema de gestión de la fabricación de piezas.

8. Referencias

- [1] J. S. Fernández and R. G. Pesudo, "Capítulo 1 Regeneración ósea. Biomateriales, sustitutos óseos y sustitutos del injerto óseo," in *Biomateriales, Regeneración Ósea.*, .
- [2] L. L. Hench, "The story of Bioglass®," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, no. 11, pp. 967–978, 2006, doi: 10.1007/s10856-006-0432-z.
- [3] L. L. Hench and J. M. Polak, "Third-generation biomedical materials," *Science (80-.)*, vol. 295, no. 5557, pp. 1014–7, 2002, doi: 10.1126/science.1067404.
- [4] C. Ning, L. Zhou, and G. Tan, "Fourth-generation biomedical materials," *Mater. Today*, vol. 19, no. 1, pp. 2–3, 2016, doi: 10.1016/j.mattod.2015.11.005.
- [5] L. L. Hench, "From Concept to Clinic," *Bioceramics*, pp. 1487–1510, 1991.
- [6] I. O. Smith, X. H. Liu, L. A. Smith, and P. X. Ma, "Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine," *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 1, pp. 226–236, 2009, doi: 10.1002/wnan.026.
- [7] D. W. Hutmacher, J. T. Schantz, and X. F. L. Christopher, "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, pp. 245–260, 2007, doi: 10.1002/term.24.
- [8] Testut and Latarjet, *Anatomia Humana*, 9th ed. Universidad de Lyon, 1988.
- [9] I. F. Hernández Gil, M. Gracia, and L. Blanco, "Factores reguladores del remodelado oseo Bases fisiológicas de la regeneración ósea II . El proceso de remodelado FASES :," 2005, pp. 151–157.
- [10] M. Zimmerman and B. Snow, *An Introduction To Nutrition And Metabolism*. 2012.
- [11] A. K. Nair, A. Gautieri, S. W. Chang, and M. J. Buehler, "Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone," *Nat. Commun.*, vol. 4, pp. 1–9, 2013, doi: 10.1038/ncomms2720.
- [12] S. A. Goldstein, "The mechanical properties of trabecular bone: Dependence on anatomic location and function," *J. Biomech.*, vol. 20, no. 11–12, pp. 1055–1061, 1987, doi: 10.1016/0021-9290(87)90023-6.
- [13] S. ALAGÖZ, "Bone tissue engineering using macroporous PHA-PLA and PHBV scaffolds produced by additive manufacturing and wet spinning," MIDDLE EAST TECHNICAL UNIVERSITY, 2016.
- [14] Silberman, "Aloinjertos óseos," *Rev. Asoc. Arg. Ortop. y Traumatol. Vol. 64, Nº 1, págs. 69-74*, vol. 64, no. Hospital de Clínicas de Buenos Aires, Buenos Aires., Buenos Aires, 1999.
- [15] M. Schiecker, H. Seitz, I. Drosse, S. Seitz, and W. Mutschler, "Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering," *Eur. J. Trauma*, vol. 32, no. 2, pp. 114–124, 2006, doi: 10.1007/s00068-006-6047-8.
- [16] Q. L. Loh and C. Choong, "Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size," *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 19, no. 6, pp. 485–502, 2013, doi: 10.1089/ten.teb.2012.0437.

- [17] A. T. Díaz *et al.*, "Sustitutos óseos Bone substitutes," vol. 26, pp. 2–13, 2008.
- [18] T. Albrektsson and C. Johansson, "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration," *Eur. Spine J.*, vol. 10, pp. S96–S101, 2001, doi: 10.1007/s005860100282.
- [19] X. Li, R. Cui, L. Sun, K. E. Aifantis, and Y. Fan, "3D-Printed Biopolymers for Tissue Engineering Application," *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2014, pp. 1–13, 2014, doi: 10.1155/2014/829145.
- [20] G. Torun Köse, H. Kenar, N. Hasirci, and V. Hasirci, "Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, no. 11, pp. 1949–1958, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00613-0.
- [21] J. Gibson, C. Lasorsa, and É. B. Hermida, "MODIFICACIÓN DE LA HIDROFILICIDAD DEL BIOPOLÍMERO PHBV MEDIANTE," 2007, [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/266492357%0AMODIFICACIÓN>.
- [22] R. Mara, M. Thiré, L. Cardoso, and L. Silva, "Morphology and Thermal Properties of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3 - hydroxyvalerate)/ Attapulgit Nanocomposites," *Mater. Res.*, no. X, pp. 1–5, 2011.
- [23] I. Zembouai, M. Kaci, S. Bruzard, A. Benhamida, Y. Corre, and Y. Grohens, "Material properties A study of morphological , thermal , rheological and barrier properties of Poly (3-hydroxybutyrate-Co-3- Hydroxyvalerate)/ polylactide blends prepared by melt mixing," *Polym. Test.*, vol. 32, no. 5, pp. 842–851, 2013, doi: 10.1016/j.polymertesting.2013.04.004.
- [24] E. I. Paşcu, J. Stokes, and G. B. McGuinness, "Electrospun composites of PHBV, silk fibroin and nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 8, pp. 4905–4916, 2013, doi: 10.1016/j.msec.2013.08.012.
- [25] S. Gogolewski and J. G. Dillon, "Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA)," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 27, pp. 1135–1148, 1993.
- [26] A. Manna and A. K. Paul, "Degradation of microbial polyester poly (3-hydroxybutyrate) in environmental samples and in culture," pp. 323–329, 2001.
- [27] H. LI, R. DU, and J. CHANG, "Fabrication, Characterization, and in vitro Degradation of Composite Scaffolds Based on PHBV and Bioactive Glass," *Biomater. Appl.*, vol. 20, no. October 2005, pp. 137–155, 2005, doi: 10.1177/0885328205049472.
- [28] X. Ye, L. Li, Z. Lin, W. Yang, M. Duan, and L. Chen, "Integrating 3D-printed PHBV/Calcium sulfate hemihydrate scaffold and chitosan hydrogel for enhanced osteogenic property," *Carbohydr. Polym.*, vol. 202, pp. 106–114, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.08.117.
- [29] W. Kosorn, M. Sakulsumbat, P. Uppanan, P. Kaewkong, S. Chantawerod, and J. Jitsaard, "PCL/PHBV blended three dimensional scaffolds fabricated by fused deposition modeling and responses of chondrocytes to the scaffolds," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 105, no. 5, pp. 1141–1150, Jul. 2017, doi: 10.1002/jbm.b.33658.
- [30] N. Galego, C. Rozsa, R. Sánchez, J. Fung, Analía Vázquez, and J. Santo Tomás, "Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials," *Polym. Test.*, vol. 19, no. 5, pp. 485–492, 2000, doi: 10.1016/S0142-

9418(99)00011-2.

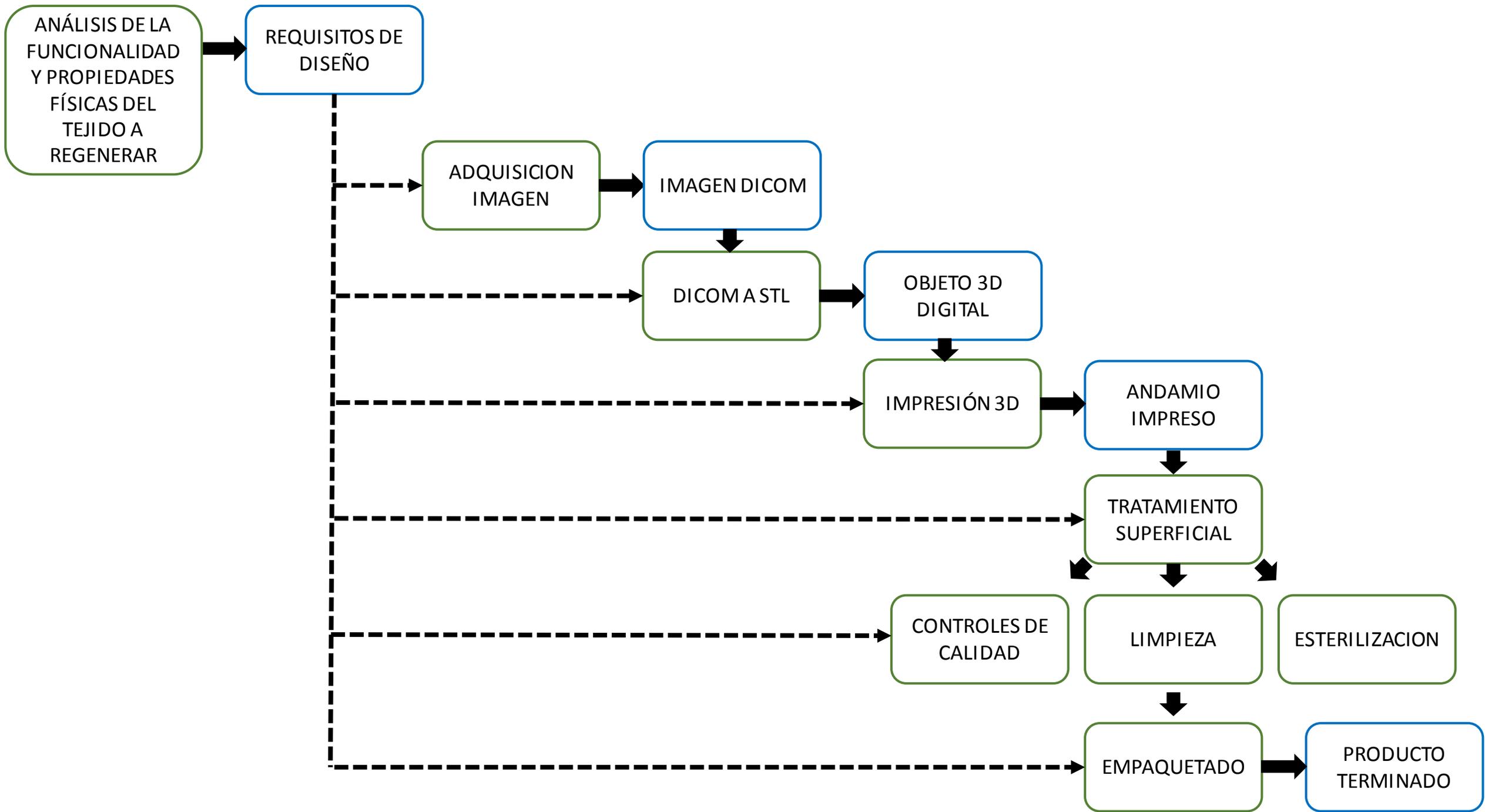
- [31] J. Wu, K. Xue, H. Li, J. Sun, and K. Liu, "Improvement of PHBV Scaffolds with Bioglass for Cartilage Tissue Engineering," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e71563, Aug. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0071563.
- [32] I. D. Xynos, A. J. Edgar, L. D. K. Buttery, L. L. Hench, and J. M. Polak, "Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 55, no. 2, pp. 151–157, 2001, doi: 10.1002/1097-4636(200105)55:2<151::AID-JBM1001>3.0.CO;2-D.
- [33] FDA, "Technical Considerations for Additive Manufactured Medical Devices Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff Preface Public Comment." 2017, [Online]. Available: <http://www.regulations.gov>.
- [34] C. L. Ventola, "Medical Applications for 3D Printing," vol. 39, no. 10, pp. 704–711, 2014, doi: 10.1016/j.infsof.2008.09.005.
- [35] J. Suarez Rodriguez and G. Ardila, "ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPONENTES PLÁSTICOS POROSOS, MEDIANTE IMPRESIÓN 3D PARA APLICACIONES DE REGENERACIÓN ÓSEA," Universidad Santo Tomás, 2015.
- [36] Food and Drug Administration, "Technical Considerations for Additive Manufactured Devices," 2016. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- [37] ANMAT, "Consideraciones Técnicas para Productos de Fabricación Aditiva," Buenos Aires, 2019.
- [38] ANMAT, "Disposicion 2318-04," vol. 2002, p. 17, 2004.
- [39] ANMAT, "Disposicion 2319/02 Reglamento Técnico Relativo a la Autorización de Funcionamiento de Empresa Fabricante y/o Importadora de Productos Médicos," vol. 2002, p. 55, 2004.
- [40] ANMAT, "Disposición 194/99 Régimen de Inspección para Fabricantes o Importadores de Productos Médicos," Buenos Aires, 1999.
- [41] B. Seed, "Silanizing Glassware," *Curr. Protoc. Cell Biol.*, vol. 8, no. 1, p. A.3E.1-A.3E.2, 2000, doi: 10.1002/0471143030.cba03es08.
- [42] C. Rodriguez-Navarro, L. Linares-Fernandez, E. Doehne, and E. Sebastian, "Effects of ferrocyanide ions on NaCl crystallization in porous stone," *J. Cryst. Growth*, vol. 243, no. 3–4, pp. 503–516, 2002, doi: 10.1016/S0022-0248(02)01499-9.
- [43] V. Stanic, *Clinical Applications of Biomaterials*. Springer Netherlands, 2017.
- [44] E. S. Watson and M. J. O'Neill, "US Patent 3,263,484 differential microcalorimeter," 1962.
- [45] S. Tognana and W. Salgueiro, "Separación de Fases y Cristalinidad en Mezclas Epoxy / poli-3-hidroxibutirato," 2013, doi: 10.4322.
- [46] P. J. Barham, A. Keller, E. L. Otun, and P. A. Holmes, "Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate," *J. Mater. Sci.*, vol. 19, no. 9, pp. 2781–2794, 1984, doi: 10.1007/BF01026954.
- [47] Gary Hodgso, A. Ranellucci, and J. Moe, "Manual de Slic3r," 2019. <https://manual.slic3r.org/>.
- [48] B. M. Tymrak, M. Kreiger, and J. M. Pearce, "Mechanical properties of components

- fabricated with open-source 3-D printers under realistic environmental conditions,” *Mater. Des.*, vol. 58, pp. 242–246, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.matdes.2014.02.038.
- [49] P. Wang, B. Zou, H. Xiao, S. Ding, and C. Huang, “Effects of printing parameters of fused deposition modeling on mechanical properties, surface quality, and microstructure of PEEK,” *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 271, no. March, pp. 62–74, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.jmatprotec.2019.03.016.
- [50] N. Toro, “Elaboración y caracterización de un material compuesto PLA y vidrio de fosfato,” UPC, 2005.
- [51] C. Abeykoon, P. Sri-Amphorn, and A. Fernando, “Optimization of fused deposition modeling parameters for improved PLA and ABS 3D printed structures,” *Int. J. Light. Mater. Manuf.*, vol. 3, no. 3, pp. 284–297, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.ijlmm.2020.03.003.
- [52] M. Fernandez-Vicente, W. Calle, S. Ferrandiz, and A. Conejero, “Effect of Infill Parameters on Tensile Mechanical Behavior in Desktop 3D Printing,” *3D Print. Addit. Manuf.*, vol. 3, no. 3, pp. 183–192, Sep. 2016, doi: 10.1089/3dp.2015.0036.
- [53] ASTM INTERNATIONAL, “Norma ASTM D638-02,” vol. 08, 2002.
- [54] ASTM, “Astm D695-02 Compressive Properties of Rigid Plastics,” vol. 14. ASTM, pp. 1–8, 2002.
- [55] C. J. Pérez, P. Eisenberg, C. Bernal, and E. Pérez, “Mechanical evaluation of polylactic acid (PLA) based composites reinforced with different calcium phosphates Mechanical evaluation of polylactic acid (PLA) based composites reinforced with different calcium phosphates.”
- [56] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [57] M. Ratto, “Análisis de la geometría de la aorta abdominal en pacientes con y sin aneurismas utilizando imágenes de tomografía computada,” Universidad Favaloro.
- [58] J. R. Caeiro, P. González, and D. Guede, “Ensayos en los distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la resistencia ósea,” *Revista de Osteoporosis y metabolismo mineral*, Madrid, pp. 1–12, Jun. 2013.
- [59] S. Lee, E. E. Novitskaya, B. Reynante, J. Vasquez, R. Urbaniak, and T. Takahashi, “Impact testing of structural biological materials,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, no. 4, pp. 730–739, May 2011, doi: 10.1016/j.msec.2010.10.017.
- [60] L. University, “Numerical modelling of impact fracture of cortical bone tissue using X-FEM,” *J. Theor. Appl. Mech.*, no. 3, pp. 599–619, 2011, [Online]. Available: <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.baztech-article-BWM6-0010-0001>.
- [61] ASTM INTERNATIONAL, “ASTM E 1820 - 01,” *ASTM INTERNATIONAL*, vol. 03, no. 01. ASTM, pp. 1–46, 2001, doi: 10.1520/E1820-09.2.
- [62] V. Vitins, M. Dobelis, J. Middleton, G. Limbert, and I. Knets, “Flexural and creep properties of human jaw compact bone for FEA studies,” *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, vol. 6, no. 5–6, pp. 299–303, 2003, doi: 10.1080/10255840310001637257.
- [63] A. P. Forero Sossa, “INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN HIDROXIAPATITA EXTRAIDA A PARTIR DE HUESO DE CERDO,” Universidad Nacional de Colombia, 2017.

- [64] J. Darr, Z. X. Guo, M. Bououdina, and I. Rehman, *Metal Organic Chemical Vapour Deposition (MOCVD) of Bone Mineral like Carbonated Hydroxyapatite Coatings Metal organic chemical vapour deposition (MOCVD) of bone mineral like carbonated hydroxyapatite coatings*, no. April. 2004, p. 2.
- [65] M. ZHOU and D. YU, "Cartilage tissue engineering using PHBV and PHBV/Bioglass scaffolds," *Mol. Med. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 508–514, Jul. 2014, doi: 10.3892/mmr.2014.2145.
- [66] E. Zeimaran *et al.*, "Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on a poly (octanediol citrate)/bioglass composite scaffold in vitro," *Mater. Des.*, vol. 109, pp. 434–442, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.matdes.2016.07.096.
- [67] L. M. W. K. Gunaratne and R. A. Shanks, "Multiple melting behaviour of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using step-scan DSC," *Eur. Polym. J.*, vol. 41, no. 12, pp. 2980–2988, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2005.06.015.
- [68] H. Satoh, N. Yoshie, and Y. Inoue, "Hydrolytic degradation of blends of poly(3-hydroxybutyrate) with poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)," *Polymer (Guildf)*, vol. 35, no. 2, pp. 286–290, Jan. 1994, doi: 10.1016/0032-3861(94)90692-0.
- [69] D. W. Van Krevelen and K. Te Nijenhuis, *PROPERTIES OF POLYMERS*. 2009.
- [70] L. A. Hockaday, K. H. Kang, N. W. Colangelo, P. Y. C. Cheung, B. Duan, and E. Malone, "Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds," *Biofabrication*, vol. 4, no. 3, p. 035005, Sep. 2012, doi: 10.1088/1758-5082/4/3/035005.
- [71] K. M. Ogden, C. Aslan, N. Ordway, D. Diallo, G. Tillapaugh-Fay, and P. Soman, "Factors Affecting Dimensional Accuracy of 3-D Printed Anatomical Structures Derived from CT Data," *J. Digit. Imaging*, vol. 28, no. 6, pp. 654–663, Dec. 2015, doi: 10.1007/s10278-015-9803-7.
- [72] F. W. Baumann, J. Wellekötter, D. Roller, and C. Bonten, "Software-aided measurement of geometrical fidelity for 3D printed objects," *Comput. Aided. Des. Appl.*, vol. 14, no. 4, pp. 486–497, Jun. 2017, doi: 10.1080/16864360.2016.1257190.
- [73] B. Duan, M. Wang, W. Y. Zhou, W. L. Cheung, Z. Y. Li, and W. W. Lu, "Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 12, pp. 4495–4505, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.06.024.
- [74] H. Balakrishnan, A. Hassan, M. U. Wahit, A. A. Yussuf, and S. B. A. Razak, "Novel toughened polylactic acid nanocomposite: Mechanical, thermal and morphological properties," *Mater. Des.*, vol. 31, no. 7, pp. 3289–3298, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.matdes.2010.02.008.
- [75] A. Akbari, M. Jawaid, A. Hassan, and H. Balakrishnan, "Epoxidized natural rubber toughened polylactic acid/talc composites: Mechanical, thermal, and morphological properties," *J. Compos. Mater.*, vol. 48, no. 7, pp. 769–781, Mar. 2014, doi: 10.1177/0021998313477461.
- [76] E. Huutilainen, R. Jaanimets, J. Valášek, P. Marcián, M. Salmi, and J. Tuomi, "Inaccuracies in additive manufactured medical skull models caused by the DICOM to STL conversion process," *J. Cranio-Maxillofacial Surg.*, vol. 42, no. 5, pp. e259–e265, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.jcms.2013.10.001.

- [77] T. Cai, F. J. Rybicki, A. A. Giannopoulos, K. Schultz, K. K. Kumamaru, and P. Liacouras, "The residual STL volume as a metric to evaluate accuracy and reproducibility of anatomic models for 3D printing: application in the validation of 3D-printable models of maxillofacial bone from reduced radiation dose CT images," *3D Print. Med.*, vol. 1, no. 1, p. 2, Dec. 2015, doi: 10.1186/s41205-015-0003-3.
- [78] O. A. Ballena Santos and O. A. Ballena Santos, "Propuesta de manual de buenas prácticas de manufactura aplicable a dispositivos médicos implantables hechos a medida fabricados por impresión 3D," *Repos. Tesis - UNMSM*, 2017, [Online]. Available: <http://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/156997>.
- [79] E. I. Shishatskaya, I. A. Khlusov, and T. G. Volova, "A hybrid PHB – hydroxyapatite composite for biomedical application : production , in vitro and in vivo investigation application : production , in vitro and in vivo investigation," vol. 5063, no. November, 2017, doi: 10.1163/156856206776986242.
- [80] V. Mega, V. Fernandez, P. Eisenberg, and E. B. Hermida, "Modificaciones en el comportamiento termomecánico de poliésteres biodegradables sometidos a irradiación gamma," *CONAMET/SAM 2006*, no. February 2015, 2007, doi: 26254213.
- [81] É. B. Hermida, V. I. Mega, O. Yashchuk, V. Fernández, P. Eisenberg, and S. S. Miyazaki, "Gamma Irradiation Effects on Mechanical and Thermal Properties and Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate) Based Films," *Macromol. Symp.*, vol. 263, no. 1, pp. 102–113, Feb. 2008, doi: 10.1002/masy.200850313.

9. Anexos



Registro	Registro de Diseño	Lab3Bio
RD-00001		
Versión 1		Página 1/6

Matrícula del profesional solicitante:	Fecha:
Nombre, Apellido e ID Paciente:	N° Orden:

Etapa 0 – Descripción de la problemática y requisitos generales.

Descripción de la problemática
Aquí se explica el objeto de la fabricación e implantación del andamio en el paciente.

Requisitos de diseño	Especificaciones de diseño
Aquí se enumeran los requisitos generales de diseño.	Aquí se enumeran las especificaciones de diseño que dan respuesta a cada uno de los requisitos planteados.

Realizado por:	
Revisado por:	
Aprobado por:	

Registro	Registro de Diseño	Lab3Bio
RD-00001		
Versión 1		Página 2/6

Etapas 1 – Adquisición de imagen anatómica

Especificaciones de Adquisición y Procesamiento

Aquí se enumeran las especificaciones del proceso de adquisición de la imagen que dan respuesta a los requisitos de diseño. Lo que abarca resolución espacial, región de interés, entre otros.

1. –
2. –
3. –

Adquisición de la imagen

Fecha de adquisición	
Método de adquisición	
Equipo utilizado	
Cantidad de imágenes	
Tiempo de adquisición	
Ancho de corte	

Nombre del archivo .DICOM	Aquí se especifica el nombre y ubicación de almacenamiento del archivo dentro del SGC.
---------------------------	--

Realizado por:	
Revisado por:	
Aprobado por:	

Registro	Registro de Diseño	Lab3Bio
RD-00001		
Versión 1		Página 3/6

Etapa 2 – Procesamiento de imagen para obtener objeto digital en 3 dimensiones

Procesamiento .Dicom a STL		
Aquí se describen las herramientas utilizadas para la realizar conversión de la imagen tomográfica a un objeto tridimensional.		
Ajustes	Software y versión	
	Brillo	
	Contraste	
	Región de interés	
Renderizado	Software y versión	
Filtros	Software y versión	
	Umbral	
	Otros	
Segmentación	Software y versión	
	Manual	SI/NO
	Detección de Bordes	SI/NO
	Crecimiento de región	SI/NO
	Apertura y Cierre	SI/NO
	Otros	
Conversión a .STL	Software y versión	
Procesamiento de la superficie	Software y versión	
	Solución de errores	SI/NO
	Suavizado	SI/NO
	Relleno de agujeros	SI/NO
	Material de soporte	SI/NO
	Otros	
Comentarios adicionales		

Archivos 3D	
N° Versión	
Nombre del archivo .AMF	Aquí se especifica el nombre y ubicación de almacenamiento del archivo dentro del SGC.
Nombre del archivo .STL	Aquí se especifica el nombre y ubicación de almacenamiento del archivo dentro del SGC.

Realizado por:	
Revisado por:	
Aprobado por:	

Registro	Registro de Diseño	Lab3Bio
RD-00001		
Versión 1		Página 4/6

Etapa 3 – Impresión 3D

Especificaciones de impresión
Aquí se describen las especificaciones relativas a la impresión 3D.
<ol style="list-style-type: none"> 1. - 2. - 3. -

Condiciones de Impresión			
Software		Versión	
Marca Impresora 3D		Modelo	
Filamento		Lote Filamento	
Temperatura Ambiente			
Humedad Ambiente			
Posición en la base	Aquí se describe el cuadrante donde se realizó la impresión		
Tiempo de impresión			
Comentarios			

Parámetros almacenados	
Aquí se especifica el nombre y ubicación de almacenamiento del archivo dentro del SGC.	
.gcode	Es el código que lee la impresora 3D.
.config	Son los parámetros de impresión definidos en el software

Información adicional	
Versión de Impresión	
Cantidad de piezas impresas	N =

Realizado por:	
Revisado por:	
Aprobado por:	

Registro	Registro de Diseño	Lab3Bio
RD-00001		
Versión 1		Página 5/6

Etapa 4 – Post Procesamiento

Especificaciones de Post Procesamiento
Aquí se describen las especificaciones relativas al procesamiento posterior a la impresión 3D.
<ol style="list-style-type: none"> 1. - 2. - 3. -

Tratamiento Superficial	
Agregado de Bioglass	SI/NO
Otros	

Limpieza General	
Eliminación de elementos de soporte	SI/NO
Lavado con etanol (x5)	SI/NO
Otros	

Empaquetado	
Tipo	

Esterilización	
Método	
Condiciones	

Realizado por:	
Revisado por:	
Aprobado por:	

Registro	Registro de Diseño	Lab3Bio
RD-00001		
Versión 1		Página 6/6

Etapa 5 – Ensayos y controles

Ensayos realizados según requisitos					
Aquí se describen todos los ensayos realizados en base a los requisitos de funcionamiento del andamio.					
Requisito	Especificación	Ensayo	Norma	Resultado	¿Cumple? Si/No
					Si/No

Descripción del grado de cumplimiento:
<ol style="list-style-type: none"> 1. - 2. - 3. -
<p>Dadas las condiciones, se considera que el andamio (Nombre) (N° Serie) (Versión de impresión) CUMPLE con los requisitos solicitados.</p> <p>Firma del responsable: _____</p>

Realizado por:	
Revisado por:	
Aprobado por:	

Registro	Registro de Diseño	Lab3Bio
RD-00001		
Versión 1		Página 7/6

Etapa 6 – Etiqueta

Etiquetado	
Aquí se describe la etiqueta.	
Fecha de fabricación	
Tiempo de almacenamiento hasta la implantación	
Nombre y Apellido	
ID	
N° Serie	
N° Versión	
Descripción de Pieza	
Materiales	
Lugar de implantación	
Tipo de esterilización	
Clase de Riesgo	

Realizado por:	
Revisado por:	
Aprobado por:	

NORMATIVA GENERAL

Manufactura Aditiva

Diseño, requisitos, guías y recomendaciones.	ASTM 52910	Revisado
Caracterización y ensayo de andamios fabricados con biomateriales; ingeniería de tejidos/productos médicos.	ASTM F2150	Revisado
Guía FDA		Revisado
Análisis de Riesgo	ISO 14971	A realizar a futuro
Sistema de Gestión de Calidad	ISO 13485	N/A

Producto Médico

Reglamento Técnico Mercosur Registro de Producto Medico	ANMAT 2318	Producto médico implantable de uso único en largo plazo. Ptos: 11 - 12 - 13 - 13.4 – 13.5
Clasificación	ANMAT 2318	Clase IV, Regla 8: <i>Todos los productos médicos implantables y los productos médicos invasivos de uso prolongado de tipo quirúrgico se incluirán en la Clase III salvo que se destinen:</i> <i>a - a colocarse dentro de los dientes, en cuyo caso se incluirán en la Clase II;</i> <i>c - a ejercer un efecto biológico o ser absorbidos totalmente o en gran parte, en cuyo caso se incluirán en Clase IV;</i> <i>d - a sufrir modificaciones químicas en el organismo, salvo si los productos se colocan dentro de los dientes, o a la administración de medicamentos, en cuyo caso se incluirán en el Clase IV.</i>
Empresas Fabricantes	ANMAT 2319	N/A
Trazabilidad	Ley 26906	N/A
Inscripción PM	ANMAT 727 ANMAT 5267	N/A

Nomenclatura	CODIGOS ECRI	Se presentan algunas opciones observadas en los listados ECRI.	
		<i>16-966</i>	<i>Injertos sintéticos de hueso</i>
		<i>17-600</i>	<i>Implantes de matriz ósea</i>
		<i>17-751</i>	<i>Implantes de Matriz ósea, Artificiales</i>
		<i>17-756</i>	<i>Implantes de Matriz ósea, Biológicos</i>

Evaluación de los Materiales

Material	Caracterización	Ensayo/Protocolo	Norma Aplicable	¿Realizado?	¿Evaluado?	Observaciones	
PHBV	ID	Fabricante	FDA (Recomendaciones)	SI	SI	Tiannan (China)	
	Composición	Fabricante	FDA (Recomendaciones)	SI	SI	1,5 % de Valerato	
	Forma	Fabricante	FDA (Recomendaciones)	SI	SI	Polvo	
	Calorimétrica	Termogravimetría (TGA)		ASTM E1131	SI	SI	Ensayos hechos por un tercero en colaboración.
		Calorimetría diferencial de barrido (DSC)		ASTM D3418 – 15 ASTM E793			
	Envejecimiento	Según tipo de envejecimiento		FDA (Recomendaciones)	NO	NO	Sería importante realizar algún ensayo de envejecimiento del material en fluido corporal simulado.
Pureza	Fabricante		FDA (Recomendaciones)	NO	NO	-	
Bioglass [®]	ID	Fabricante	FDA (Recomendaciones)	SI	NO	B5S5 Alemania	
	Composición	Fabricante	FDA (Recomendaciones)	SI	NO	-	
	Forma	Fabricante Microscopía Electrónica		FDA (Recomendaciones)	SI	NO	Cristales ~5µm verificado con imágenes SEM

Evaluación de los Filamentos

FILAMENTO	Caracterización	Ensayo/Protocolo	Norma Aplicable	¿Realizado?	¿Evaluado?	Observaciones
Filamento de PHBV Filamento de PHBV+BG	Calorimétrica	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	ASTM D3418 ASTM E793	SI	NO	Punto Fusión Cristalinidad
	Mecánica	Tracción	ASTM D638	SI	SI	Módulo Elástico Tensión Máxima
	Morfológica	Microscopía Electrónica	ASTM D792	SI	NO	Corte transversal

Evaluación del Proceso de Extrusión

Proceso	Caracterización	Ensayo/Protocolo	Norma Aplicable	¿Realizado?	¿Evaluado?	Observaciones
Extrusión	Parámetros	Visual y experimental	ASTM D1238	SI	NO	Se realizó el proceso de extrusión. Se realizó un control de parámetros, pero no se tuvo en cuenta la norma para la determinación del flujo de salida de material.

Evaluación del Proceso de Diseño de Piezas para ensayos

Proceso	Protocolo	Norma Aplicable	¿Realizado?	¿Evaluado?	Observaciones
Diseño de piezas en SolidWorks	Visual y experimental	FDA (Recomendaciones)	SI	NO	El diseño de las piezas varía según cada aplicación. Se realizó un mismo protocolo para todas las piezas impresas, pero no se rige según una norma específica.

Evaluación del Proceso .Dicom a .STL

Proceso	Objeto de Evaluación	Protocolo	Norma Aplicable	¿Realizado?	¿Evaluado?	Observaciones
Obtención de Tomografía	Resolución y contraste de imagen	Performance de sistema utilizado	ASTM E1695 Resolución 610/2004	NO	NO	Se trabajó a partir de tomografías disponibles online u obtenidas en marcos colaborativos.
Selección de Imagen Tomográfica	Resolución y contraste de imagen	Propio		NO	NO	
Procesamiento de Imagen	Transformación de .DICOM a .STL	Diseño propio	FDA (Recomendaciones)	SI	NO	Ver sección dedicada y formularios
	Resguardo de Información del paciente	Diseño propio	Ley 26529 FDA (Recomendaciones)	NO	NO	Se utilizaron imágenes anónimas. Ver Formularios
	Almacenamiento de Archivos	Diseño propio	ASTM 52915	NO	NO	Ver Formularios

Evaluación del Proceso de Impresión

Proceso	Objeto de evaluación	Ensayo/Protocolo	Norma Aplicable	¿Realizado?	¿Evaluado?	Observaciones
Caracterización de la impresora	Especificaciones de impresora	Fabricante	FDA (Recomendaciones)	SI	SI	
	Calibración de Impresora	Fabricante / Lab3Bio	FDA (Recomendaciones)	SI	SI	Se realizan calibraciones con el uso constante del equipo
	Reproducibilidad de impresión	Diseño propio	FDA (Recomendaciones)	SI	SI	
	Parámetros relevantes	Diseño propio	FDA (Recomendaciones)	SI	SI	
Impresión 3D de piezas y/o andamios	Almacenamiento de información	Diseño propio	FDA (Recomendaciones)	SI	SI	
	Condiciones de impresión	Diseño propio	FDA (Recomendaciones)	SI	SI	Referido al ambiente en el cual se realiza el proceso de impresión y la limpieza de los elementos de la impresora.

Evaluación de Procesos de Post Impresión

Proceso	Protocolo	Norma Aplicable	¿Realizado?	¿Evaluado?	Observaciones
Tratamiento superficial de los andamios	Diseño propio	FDA (Recomendaciones)	SI	NO	

Evaluación de los Andamios

OBJETO DE ESTUDIO	Caracterización	Ensayo/Protocolo	Norma Aplicable	¿Realizado?	¿Evaluado?	Observaciones
Andamios impresos	Mecánica	Tracción	ASTM D638	SI	SI	
		Compresión	ASTM D695	SI	SI	
		Flexión	ASTM D790	SI	SI	
		Fractura	Otro Autor	SI	SI	
		Impacto	ASTM D256	SI	SI	
		Fatiga	Según finalidad	NO	NO	Sería útil realizarlo según aplicación
	Morfológica	Pesaje	FDA (Recomendaciones)	SI	SI	
		Porosidad	ASTM D4404	NO	NO	Se realizó el estudio de los canales, pero no se ha evaluado la porosidad aplicando ninguna norma.
		Canales y Ancho de Filamento	FDA (Recomendaciones)	SI	SI	
		Fidelidad y Reproducibilidad	FDA (Recomendaciones)	SI	SI	Medición manual, podría realizarse un scan tridimensional para comparaciones más certeras
	Actividad Biológica	Citotoxicidad	FDA ISO 10993	SI	SI	En Lab3Bio se han realizado ensayos de este tipo. No aplican al presente trabajo.
		Biocompatibilidad	ISO 10993	SI	SI	
	Adhesión Celular	Imágenes SEM	FDA (Recomendaciones)	SI	NO	
	Superficie	Rugosidad	FDA (Recomendaciones)	SI	NO	Se obtuvieron Imágenes SEM
Composición		SI		SI	Imágenes SEM de la superficie que demuestran formación de HA. Además de estudios EDS en otra etapa del proyecto.	

Evaluación del Producto Terminado

Objeto de Estudio	Ensayo/Protocolo	Norma Aplicable	¿Realizado?	¿Evaluado?	Observaciones
Esterilización	Gamma; Autoclave	Resolución 1547/2007	NO	NO	Según experiencias de terceros y otros proyectos realizados dentro del Lab3Bio, se espera que la esterilización por rayos gamma sería la más efectiva y menos nociva para los andamios.
Empaquetamiento	Doble Pouch de esterilización	ASTM F1884 FDA (Recomendaciones)	NO	NO	Realizado dentro del Lab3Bio. No aplica al presente trabajo
Etiquetado	Diseño propio	FDA (Recomendaciones) ASTM F2097	NO	NO	Ver Registro de Diseño
Registro de Diseño	Diseño propio	FDA (Recomendaciones)	SI	NO	Ver Registro de Diseño