

**Desarrollo de un algoritmo para evaluación *in vitro* de la porosidad en biomateriales empleados para regeneración tisular por medio de análisis digital de imágenes**

Camilo Andrés Martínez Medina  
Juan Camilo Acosta Godoy



Facultad de Ingeniería  
Programa de Bioingeniería  
Bogotá, Colombia.  
2016

**Desarrollo de un algoritmo para evaluación *in vitro* de la porosidad en biomateriales empleados para regeneración tisular por medio de análisis digital de imágenes**

Camilo Andrés Martínez Medina  
Juan Camilo Acosta Godoy

Modalidad: Producto

Tutor académico: José Francisco Ibla Gordillo  
Asesor metodológico: Gabriel Alberto Puerta Aponte

Universidad el Bosque  
Facultad de Ingeniería  
Programa de Bioingeniería  
Bogotá, Colombia  
2016

## **Agradecimientos**

Principalmente **Prof. José Francisco Ibla** por la orientación seguimiento y supervisión continua en la misma, pero sobre todo por la motivación y apoyo recibido no solo recibida en esta investigación, sino en todos estos años.

**Prof. María Eugenia Guerrero** por el interés y sugerencias en el proyecto, al **Ingeniero Gabriel Alberto Puerta Aponte** por la gran ayuda brindada en la parte metodológica.

Al **Grupo de investigación UIBO** a la **Dra. Sandra Janneth Perdomo Lara** y Grupo de investigación de **VIROLOGÍA** a la **Dra. Myriam Lucia Velandia Romero y Sigrid Johanna Camacho Ortega** por brindarnos su ayuda en la toma de las muestras para el desarrollo del proyecto.

A la **Universidad el Bosque** quien nos acogió todos estos años y a cada uno de los profesores que nos brindar el apoyo académico y profesional en todo el proceso formativo.

## Resumen

En el campo de la tecnología para la ingeniería tisular, el desarrollo de biomateriales ha tomado relevancia en los últimos años debido al número de ventajas que presentan como sistema para sustitución, reemplazo y evaluación en tratamientos fisiológicos a pacientes con lesiones. Los biomateriales brindan una buena alternativa, teniendo en cuenta que muchos de ellos proporcionan un entorno apropiado para el crecimiento y la interacción celular además de una integración para la formación de nuevos tejido según sea su uso.

La porosidad es una propiedad física con una relación directa en el proceso de adhesión y desarrollo celular, debido a que es por medio de estos campos vacíos que las células colonizan un material y lo adhieren al sistema. Este trabajo presenta el desarrollo de un algoritmo para la evaluación *in vitro* de la porosidad por medio del análisis de imágenes adquiridas por técnicas de microscopía óptica y electrónica de barrido en donde se evidencia la evaluación del proceso de adherencia e integración celular a los materiales, identificando el valor porcentual de porosidad de la imagen utilizada, el volumen total del material y los valores reales y porcentuales del volumen libre de las muestras. A este análisis se le realizó una evaluación de precisión para establecer la repetibilidad y reproducibilidad del método brindándole mayor soporte a la técnica. Los resultados de este trabajo mostraron que la porosidad porcentual de los biomateriales estudiados como PLGA y matriz extracelular de intestino delgado de cerdo puede ser cuantificada con buena repetibilidad sin afectar propiedades químicas, físicas y biológicas de la muestra, como también se puede evidenciar la cuantificación de porosidad en el biomaterial *in vitro* Hidroxiapatita con osteoblastos sin verse afectado el cálculo por la presencia de material biológico.

Palabras claves: Porosidad, Biomaterial, Algoritmo, Análisis de imágenes, Microscopia.

## **Abstract**

In tissue engineering technology, biomaterials have taken a great relevance in recent years due to the long number of advantages over replacement system on different kind of tissue and physiological assessment on injury of patients. These biomaterials have provided a good alternative, considering several properties to improve the growing cell process and their interaction and integration for tissue regeneration renewal. Porosity is a physical property, which has a direct relationship with a cell adhesion process because of those free spaces on these materials control that biological phenomena.

This work represents the development of an algorithm for *in vitro* evaluation of porosity by a computer-assisted image analysis using an optical and scanning electron microscopy. The results showed percentage of porosity value, the total volume at free volume of samples of PLGA scaffolds, Hydroxyapatite and extracellular matrix. The repeatability and reproducibility of the all measurements were evaluated to analyze the reliability of this technique.

**Keywords:** Porosity, Biomaterial, Algorithm, Image analysis, Microscopy.

## Tabla de contenidos

Tabla de contenidos	III
Índice de ilustraciones	V
Índice de tablas	VII
Introducción	8
Glosario	9
1 Definición de problema	10
1.1 Antecedentes	10
1.2 Planteamiento del problema	15
1.3 Descripción y justificación	16
2 Estado del arte	18
2.1 Fundamentación teórica	18
2.1.1 Marco teórico- conceptual	18
2.1.2 Poli (D, L-lactico-co-glicolico) (PLGA)	20
2.1.3 Normas ASTM e ISO estándares de desarrollo en metodologías de cuantificación de porosidad.	24
2.1.4 Repetibilidad y reproducibilidad (r&R)	25
2.1.5 Microscopia óptica	26
2.1.6 Algoritmo y análisis de imágenes	27
2.2 Estado de la técnica	28
2.2.1 ImagenJ	28
2.2.2 ¿Qué es Matlab?	31
2.2.3 Vectores y matrices	32
2.2.4 Tipos de imágenes digitales	34
2.2.5 Algoritmo de Thinning	44
2.2.6 Algoritmo Slip & Merge	45
2.2.7 Filtros Canny	46
3 <i>Objetivos</i>	51
3.1 Objetivo general	51
3.2 Objetivos específicos	51
4 Descripción del producto y matriz de requerimientos	52
5 Metodología	55
5.1 Consulta en bases de datos y características mínimas de los materiales para uso biológico.	55
5.2 Desarrollo Algoritmo: funciones básicas y desarrollo total.	55

5.2.1	Etapa 1. Obtención de imágenes	55
5.2.2	Etapa 2. Desarrollo del código	55
5.2.3	Etapa 3 Análisis y procesamiento de las imágenes con el algoritmo	56
5.2.4	Etapa 4 Obtención de resultados	56
5.3	Diseño global y detallado	57
6	Implementación y pruebas	59
6.1	Determinación teórica de incertidumbres y cálculos de volumen	59
6.2	Algoritmo de tres capas para la cuantificación de porosidad porcentual.	62
6.3	Profundización y explicación detallada del algoritmo desarrollado	63
6.3.1	Sección (A) del diagrama	63
6.3.2	Sección (B) del diagrama	63
6.3.3	Sección (C) del diagrama	64
6.3.4	Sección (D) del diagrama	67
6.3.5	Sección (E) del diagrama	67
6.3.6	Sección (G) del diagrama	68
6.3.7	Sección (F) del diagrama	69
6.3.8	Sección (H) del diagrama	70
6.4	Obtención de las muestras de los biomateriales.	71
6.5	Imágenes obtenidas	71
6.5.1	Muestra PLGA	71
6.5.2	Muestra Matriz extracelular de cerdo	81
6.5.3	Muestra Hidroxiapatita con osteoblastos	88
7	Resultados	96
7.1	Norma F1854-15	96
7.2	Resultados obtenidos por el algoritmo	100
7.3	Análisis de Resultados	105
8	Discusión	109
9	Conclusiones	111
10	Recomendaciones	112
11	Referencias	113
12	Anexos	117
12.1	Anexo 1. Guía de usuario para correr el algoritmo desarrollado en Matlab con una muestra de PLGA.	117

## *Índice de ilustraciones*

Ilustración 1 Microscopia electrónica de barrido de ECO-material y sus umbrales.	14
Ilustración 2 Árbol de problemas cuantificación de porosidad en biomateriales.	15
Ilustración 3 Síntesis del copolímeropoli (D, L-láctico-co-glicólico), PLGA.	21
<i>Ilustración 4 Configuración condensador/objeto de la microscopia óptica</i>	27
Ilustración 5 Imagen original de la distribución de embriones de equinodermos.	29
Ilustración 6 Imagen en escala de grises.	29
Ilustración 7 Transformación de la imagen a binario.	30
Ilustración 8 Limpieza de contenido de las imagen.	30
<i>Ilustración 9 Matriz de color plano RGB.</i>	36
<i>Ilustración 10 Representación de una imagen a escala de grises en Matlab.</i>	37
<i>Ilustración 11 Representación valores de pixel imágenes binarias.</i>	37
<i>Ilustración 12 Representación de imagen indexa.</i>	38
<i>Ilustración 13 Digitalización y almacenamiento de imagen.</i>	40
Ilustración 14 Mejora de contraste en pre-procesamiento.	40
<i>Ilustración 15 Etapas de procesamiento en segmentación.</i>	41
<i>Ilustración 16 Simplificación eliminación del ruido</i>	42
<i>Ilustración 17 Separación de objetivos de interés con respeto al fondo.</i>	42
<i>Ilustración 18 Proceso de binarizado de la imagen.</i>	43
<i>Ilustración 19 Cierre de contornos mediante identificación de pixeles.</i>	43
<i>Ilustración 20 a) Imagen original, b) peso bajo c) peso medio y d) peso alto. Ejemplo de Criterio de Homogeneidad combinando textura con característica de color.</i>	45
<i>Ilustración 21 . (a)Imagen sintética, (b) Imagen dividida y fusionada. Función Algoritmo Slip &amp; Merge.</i>	46
Ilustración 22 Asignación de código para cierre de contornos.	49
Ilustración 23 Tratamiento de imágenes filtros Canny.	49
Ilustración 24 Resultado detección de bordes Canny, Roberts y Prewitt.	50
Ilustración 25 Diagrama de funcionamiento esperado del algoritmo primera parte.	52
Ilustración 26 Diagrama Rango de valores que maneja el algoritmo según su salida.	53
Ilustración 27 Diseño global en el cual se basó el diseño desarrollo.	57
Ilustración 28 Diseño detallado en el cual se basó el desarrollo.	57
Ilustración 29 Funciones deseadas para el algoritmo.	58
Ilustración 30 Diagrama del algoritmo según el funcionamiento deseado y desarrollado	62
Ilustración 31 Micrografía de PLGA Original.	72
<i>Ilustración 32 Micrografía de PLGA muestra 1 a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.</i>	72
Ilustración 33 Micrografía de PLGA muestra 1 a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.	73
<i>Ilustración 34 Micrografía de PLGA muestra 1 a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.</i>	74
<i>Ilustración 35 Micrografía de PLGA muestra 4 Imagen de PLGA Original</i>	75
Ilustración 36 Micrografía de PLGA muestra 4 a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.	76
Ilustración 37 Micrografía de PLGA muestra 4 a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.	76
Ilustración 38 Micrografía de PLGA muestra 4 a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.	77



<i>Ilustración 39 Micrografía de PLGA muestra 5 Imagen de PLGA Original.</i>	78
<i>Ilustración 40 Micrografía de PLGA muestra 5 a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado</i>	78
<i>Ilustración 41 Micrografía de PLGA muestra 5 a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.</i>	79
<i>Ilustración 42 Micrografía de PLGA muestra 5 a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.</i>	80
<i>Ilustración 43 Micrografía de Matriz extracelular muestra 1 Imagen Original.</i>	81
<i>Ilustración 44 Micrografía de Matriz extracelular muestra 1 a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.</i>	81
<i>Ilustración 45 Micrografía de Matriz extracelular muestra 1 a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.</i>	82
<i>Ilustración 46 Micrografía de Matriz extracelular muestra 1 a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.</i>	83
<i>Ilustración 47 Micrografía de Matriz extracelular muestra 2 Imagen Original.</i>	83
<i>Ilustración 48 Micrografía de Matriz extracelular muestra 2 a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.</i>	84
<i>Ilustración 49 Micrografía de Matriz extracelular muestra 2 a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.</i>	84
<i>Ilustración 50 Micrografía de Matriz extracelular muestra 2 a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.</i>	85
<i>Ilustración 51 Micrografía de Matriz extracelular muestra 3 Imagen Original</i>	86
<i>Ilustración 52 Micrografía de Matriz extracelular muestra 3 a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado</i>	86
<i>Ilustración 53 Micrografía de Matriz extracelular muestra 3 a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.</i>	87
<i>Ilustración 54 Micrografía de Matriz extracelular muestra 3 a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.</i>	87
<i>Ilustración 55 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1 a un zoom 1100x imagen original.</i>	88
<i>Ilustración 56 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 1100x a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.</i>	89
<i>Ilustración 57 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 1100x a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.</i>	90
<i>Ilustración 58 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 1100x a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.</i>	90
<i>Ilustración 59 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 1500x imagen original.</i>	91
<i>Ilustración 60 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 1500x a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.</i>	91
<i>Ilustración 61 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos. Zoom 1500x a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.</i>	92
<i>Ilustración 62 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 1500x a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.</i>	92

Ilustración 63 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1, Zoom 3000x imagen original.	93
Ilustración 64 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 3000xa) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.	94
Ilustración 65 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblasto muestra 1. Zoom 3000x a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.	94
Ilustración 66 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos. Muestra 1. Zoom 3000x a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.	95
Ilustración 67 Distanciamiento de las líneas superpuestas sobre la interfaz del sustrato.	98

### *Índice de tablas*

<i>Tabla 1. Biomateriales utilizados en regeneración o remplazo, permanente o parcial.</i>	10
Tabla 2 Propiedades mecánicas del PLGA.....	22
Tabla 3 Normas ASTM e ISO para medición de porosidad en materiales.....	24
Tabla 4 Elementos vectores y matrices MATLAB.....	33
Tabla 5 Extensiones de formato de imágenes usadas en Matlab.....	34
Tabla 6 Clases de imágenes.....	35
Tabla 7 Requerimientos deseados para el algoritmo desarrollado.....	54
Tabla 8 Tabla de resultados obtenidos de las imágenes de PLGA con la misma escala de zoom en diferentes puntos de la muestra.....	101
Tabla 9 Tabla de resultados obtenidos de las imágenes de matriz extracelular de cerdo misma escala de zoom en diferentes puntos de la muestra.....	102
Tabla 10 Tabla de resultados obtenidos de las imágenes de Hidroxiapatita (HAp) con osteoblastos misma escala de zoom en diferentes puntos de la muestra.....	103
Tabla 11 Tabla de resultados obtenidos de la misma muestra de matriz extracelular de cerdo por medio de 5 repeticiones de algoritmo desarrollado en Matlab.....	104

## **Introducción**

Los biomateriales han sido uno de los elementos más empleados en las últimas décadas para el tratamiento, sustitución y reemplazo de tejidos que han sido perjudicados por alguna enfermedad o lesión. La modernización de estos biomateriales ha tomado un gran protagonismo ya que son una forma más sencilla y efectiva de apoyar procesos de tratamientos de recuperación, sustituyendo materiales tradicionales, que además de aumentar el riesgo de generar daños al paciente, aumentan los tiempos de estancia en el organismo lo que se evidencia en la pérdida de la calidad de vida.

Es así, como se pretende realizar una propuesta basada en la construcción de un algoritmo para la cuantificación de porosidad en biomateriales empleados en ingeniería tisular por medio de análisis de imágenes, para lograr un mejoramiento en la calidad de fabricación de biomateriales empleados para tal fin, brindándole al fabricante una herramienta de fácil accesibilidad con la cual pueda tener un conocimiento más amplio y detallado de la composición estructural del material desarrollado.

Dirigido a fabricantes y laboratorios donde se emplean biomateriales, esta metodología ofrece una facilidad de uso por parte del usuario, ya que no necesita una alta experiencia de manejo de Matlab, además de esto permite conocer paso a paso el proceso de tratamiento de las imágenes estudiadas dando a conocer al usuario características de su material. A diferencia de otras metodologías en la cuales se emplean sustancias químicas para realizar estudios de caracterización de materiales, este método no emplea ningún tipo de elemento adicional, garantizando que no hayan alteraciones en la muestra.

Lo anterior conduce a la presentación del documento como desarrollo y resultado del proceso de elaboración de esta metodología. De esta forma, se contemplan cuatro principales etapas. La primera de ellas es el desarrollo y explicación detallada del código elaborado, mostrando al lector cada una de las partes que conforman el algoritmo y como trabaja cada una de ellas; la segunda el tratamiento que se realiza a cada una de las imágenes de los biomateriales obtenidos por medio de microscopia óptica y electrónica de barrido; por su parte, la tercera etapa muestra los resultados después del procesamiento analítico del algoritmo sobre las imágenes así como la explicación de cada uno de ellos; por último, esta etapa engloba las conclusiones obtenidas durante la realización del proyecto.

## Glosario

**Algoritmo.** Proceso o conjunto de reglas que deben seguirse en los cálculos u otras operaciones para la resolución de problemas (Oxford, 2016).

**Biocompatibilidad.** Palabra que se utiliza para hablar de propiedades de los biomateriales y se define como la capacidad de un material para existir en el cuerpo humano sin generar ningún efecto nocivo (Rezaie et al., 2015).

**Biomaterial.** Materiales sintéticos o naturales que se utilizan para reemplazar directamente, cambiar o mejorar los tejidos vivos que han sido dañados por enfermedades, traumatismos, accidentes, etc. Este biomaterial puede ser de una sola o en combinación con otros materiales que se utilizan en los tejidos vivos en tiempos diferentes (Rezaie, Bakhtiari, Öchsner Biomaterials, & Applications, 2015).

***In vitro*:** Método para el estudio de las reacciones o procesos que tienen lugar en un ambiente artificial fuera del organismo vivo (DeCS, 2016a).

**Material / Material.** El conjunto de objetos utilizados por una organización en cualquier tarea, tales como equipamiento, aparatos, herramientas, maquinaria, útiles y suministros. (PMBOK, 2016).

**Matriz extracelular.** Sustancia en forma de red que se encuentra en el espacio extracelular y en asociación con la membrana basal de la superficie celular. Estimula la proliferación nuclear y brinda una estructura de apoyo a la cual las células o los lisados celulares se adhieren en los discos de cultivo (DeCS, 2016a).

**Polímeros.** Los polímeros son moléculas de cadena larga que constan de un gran número de pequeños monómeros que se repiten (unidad composita). Los polímeros pueden ser derivados o bien de fuentes naturales o de fuentes orgánicas sintéticas. Estos materiales ya se han utilizado en herramientas para cirugías, dispositivos implantables, recubrimientos de dispositivos, injertos vasculares, biomateriales inyectables y terapéutica (Rezaie et al., 2015). V.

**Porosidad.** Situación de tener poros o espacios abiertos. Con frecuencia se refiere a los huesos, a los implantes de huesos, o cementos de huesos, pero puede referirse al estado poroso de cualquier sustancia sólida. (DeCS, 2016b).

**Recubrimiento poroso (*porous coating*).** El recubrimiento de un implante deliberadamente aplicado para contener regiones vacías con la intención de mejorar la fijación del implante. (ASTM, 2010).

# 1 Definición de problema

## 1.1 Antecedentes

Hay un gran número de biomateriales los cuales presentan aplicaciones en salud humana como se muestra en el *Tabla 1*, entre ellos encontramos materiales metálicos, cerámicos, aleaciones, polímeros naturales y sintéticos, implementados en los sistemas como el cardiovascular, esquelético, ocular o en diferentes órganos (Navarrete, 2014). Dichos materiales se emplean ya que son aptos para permanecer temporal o definitivamente dentro del cuerpo humano, período de implementación en el cual existen procesos de degradación sin un efecto de toxicidad en permanentes y los temporales cumpliendo su periodo de vida útil dentro del cuerpo después de esto deben ser retirados para evitar problemas de salud se por toxicidad o por pérdida de propiedades físicas (Navarrete, 2014).

*Tabla 1. Biomateriales utilizados en regeneración o remplazo, permanente o parcial.*

Aplicación	Materiales utilizados
<b>Esquelético</b>	
Reemplazo de articulaciones (cadera, rodilla)	Titanio, aleaciones TI-AL-V, acero inoxidable, polietileno (PE)
Placas óseas	Acero inoxidable, aleaciones de cobalto-cromo
Cemento óseo	Polimetilmetacrilato
Reparación de defectos óseos	Hidroxiapatita (HAp)
Tendones y ligamentos artificiales	Teflón, dacrón
Implantes dentales	Titanio, óxido de aluminio, fosfato de cálcico
<b>Sistema cardiovascular</b>	
Injertos vasculares	Dacrón, teflón, poliuretano (PU)
Válvulas del corazón	Tejidos modificados, acero inoxidable, fibra de carbono
Catéter	Silicona, teflón, PU
<b>Reemplazo de órganos</b>	
Corazón artificial	PU
Sustituto de la piel	Silicona, colágeno compuesto
Riñón artificial	Celulosa, poliacrilonitrilo
Máquina de corazón-pulmón	Silicona
<b>Órganos de los sentidos</b>	
Reemplazo coclear	Electrodos de platino
Lentes intraoculares	PMMA, silicona, hidrogeles
Lentes de contacto	Acrilatos de silicona, hidrogeles
Apego corneal	hidrogeles de colágeno

*Fuente.*(Navarrete, 2014).

La porosidad en los biomateriales juega un papel crucial en la formación de cualquier tejido por ejemplo para el sistema óseo en el entorno biológico del cuerpo, como también es crucial para el reemplazo en piel debido a que este tipo de biomaterial debe ser semipermeable y así permitir el transporte de nutrientes por la membrana. Actualmente se utilizan métodos de aproximación a un porcentaje de porosidad los cuales implican el uso de algunas sustancias químicas, diferencias de presión o sonido, entre otros (Chu, 2013).

Existen diferentes métodos para la medida de porosidad en biomateriales clasificados en dos diferentes tipos: los métodos directos en los cuales afectan de manera directa al material a medir y los métodos indirectos los cuales por medio de características superficiales no afectan o influyen directamente en la muestra logrando obtener diferentes propiedades del material (Ministerio Nacional De Vías, 2003).

A continuación se presentan los métodos directos que se usan actualmente para la medición de porosidad:

#### *Método de cuantificación de porosidad por picnometría*

En este método se utiliza un picnómetro el cual es un instrumento cuyo volumen es conocido y permite conocer la densidad de líquidos y sólidos mediante gravimetría una determinada temperatura, su metodología para sólido es llenar el picnómetro a ras, pesando esta muestra. Seguido de esto se llena el picnómetro con agua desionizada o destilada, de esta manera el peso del líquido es desplazado y se logra hallar la densidad del sólido (Fossard, 2005).

Teniendo en cuenta que el volumen es siempre el mismo:

$$V_{agua} = V_{muestra} \quad [1]$$

*Equivalencia entre volumen de agua y volumen de muestra.*

*Fuente.(Fossard, 2005).*

Teniendo en cuenta esto y siendo la ecuación de densidad:

$$\rho = \frac{m}{V} \quad [2]$$

*Ecuación de densidad.*

*Fuente.(Fossard, 2005).*

Se entiende que la densidad será dada por la masa, de acuerdo a esto la ecuación para esto es:

$$\rho_1 = \frac{m_1}{m_2} \rho_2 \quad [3]$$

*Ecuación de densidad  $\rho_1$ .*

*Fuente.(Fossard, 2005).*

Siendo  $m_1$  masa de muestra contenido en el picnómetro,  $\rho_1$  densidad de la muestra contenido en el picnómetro,  $m_2$  masa de agua (o líquido de densidad conocida) contenido en el picnómetro,  $\rho_2$  densidad del agua (o líquido de densidad conocida) contenido en el picnómetro.(Fossard, 2005).

En este método las muestras sólidas tienden a quedar con puntos vacíos o remanentes los cuales dificultan la medida, para ello es necesario un proceso adicional donde se pesa el picnómetro con el sólido inicialmente, posteriormente se debe llenar la muestra con un líquido de densidad conocida, volver a pesar y continuar el protocolo común, debido a esto las incertidumbres se pueden ver afectadas por el tipo de material y el fluido utilizado con éste (Ministerio Nacional De Vias, 2003).

#### *Método de cuantificación por medio de registro sónico*

Se basa en medir el tiempo en microsegundos que se demora en atravesar una onda el material a estudiar y según el tiempo se puede determinar la porosidad por medio de la ecuación de tiempo promedio de Wyllie (Karageorgiou & Kaplan, 2005).

$$\frac{1}{V_p} = \frac{1-\Phi}{V_{pS}} + \frac{\Phi}{V_{pF}} \quad [4]$$

*Tiempo promedio de Wyllie.*

*Fuente. (Karageorgiou & Kaplan, 2005).*

Donde  $\Phi$  es la porosidad,  $V_{pS}$  es la velocidad de la onda P en el sólido o matriz,  $V_{pF}$  es la velocidad P en el fluido dentro de los poros y la  $V_p$  es la velocidad P medida. El comportamiento de la velocidad respecto a la porosidad es más bajo cuando la porosidad aumenta, mientras que la velocidad es más alta cuando la porosidad se hace menor (Karageorgiou & Kaplan, 2005).

En este estudio de porosidad es necesario tener en cuenta la imposibilidad de medir materiales que contengan un alto porcentaje de líquido o que lleguen a presentar una resistencia mayor a 250 ohm, ya que puede generar errores de medición (Chang, 2006).

#### *Cuantificación de porosidad por densidad*

Este tipo de estudio se realiza por la medición de la densidad en electrones según la formación del material, los valores de densidad varían por medio de la saturación del sólido por medio de líquidos. Para poder determinar la porosidad se utiliza un perfil de densidad conocido según la matriz y la densidad del fluido que satura la formación (Mendez, 2006).

$$\phi_{Densidad} = \frac{\rho_{matriz} - \rho_{registro}}{\rho_{matriz} - \rho_{fluido}} [5]$$

*Cuantificación de porosidad por densidad.*

*Fuente. (Mendez, 2006).*

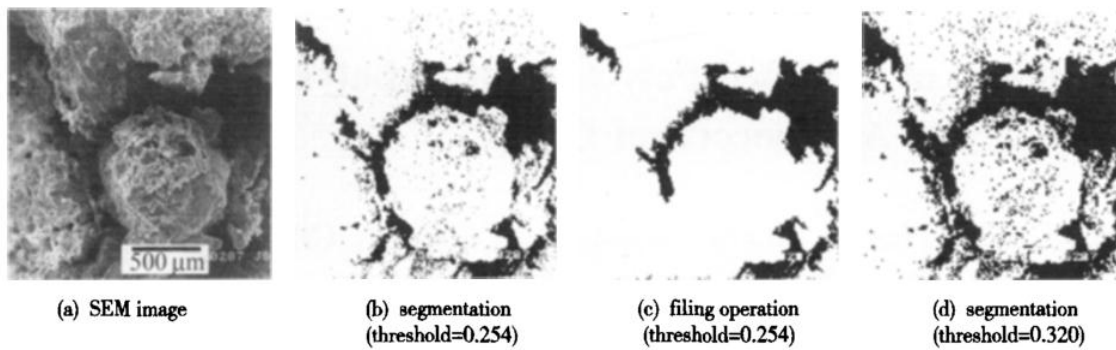
Donde  $\phi$  es la densidad que se desea conocer  $\rho_{matriz}$  es la densidad que posee el sólido del cual está compuesto el material,  $\rho_{fluido}$  es la densidad del líquido que se le coloca al material y  $\rho_{registro}$  es la densidad que se registra del material al atravesarlo con una carga de electrones aproximadamente de  $10^6$  eV con respecto al tiempo (Mendez, 2006).

Cuando se utiliza este método es necesario que la muestra no posea diferentes composiciones, ya que la presencia de un material diferente puede causar errores de medición, esto se debe a que cada material tiene características específicas lo que puede alterar la medición generando un mayor margen de error (Mendez, 2006).

Los métodos nombrados anteriormente son los más usados en el mercado para la medición de la porosidad de manera directa, actualmente se conoce solo una técnica que cuantifica la porosidad de manera indirecta en materiales la denominada Microscopia Electrónica De Barrido (SEM). Esta técnica mide el porcentaje de concentración de composición química del material, además saca una imagen de su estructura a una escala deseada. Esta imagen es analizada por un programa computacional que identifica las características de la imagen entre ellas la cantidad de poros en la superficie, con base en esto se obtiene un porcentaje del valor aproximado de porosidad presente en la imagen. Hay que aclarar que estos instrumentos cuentan con una incertidumbre (Ji-ru, Yuan-zhi, & Zu-de, 2004).



*Ilustración 1 Microscopia electrónica de barrido de ECO-material y sus umbrales.*



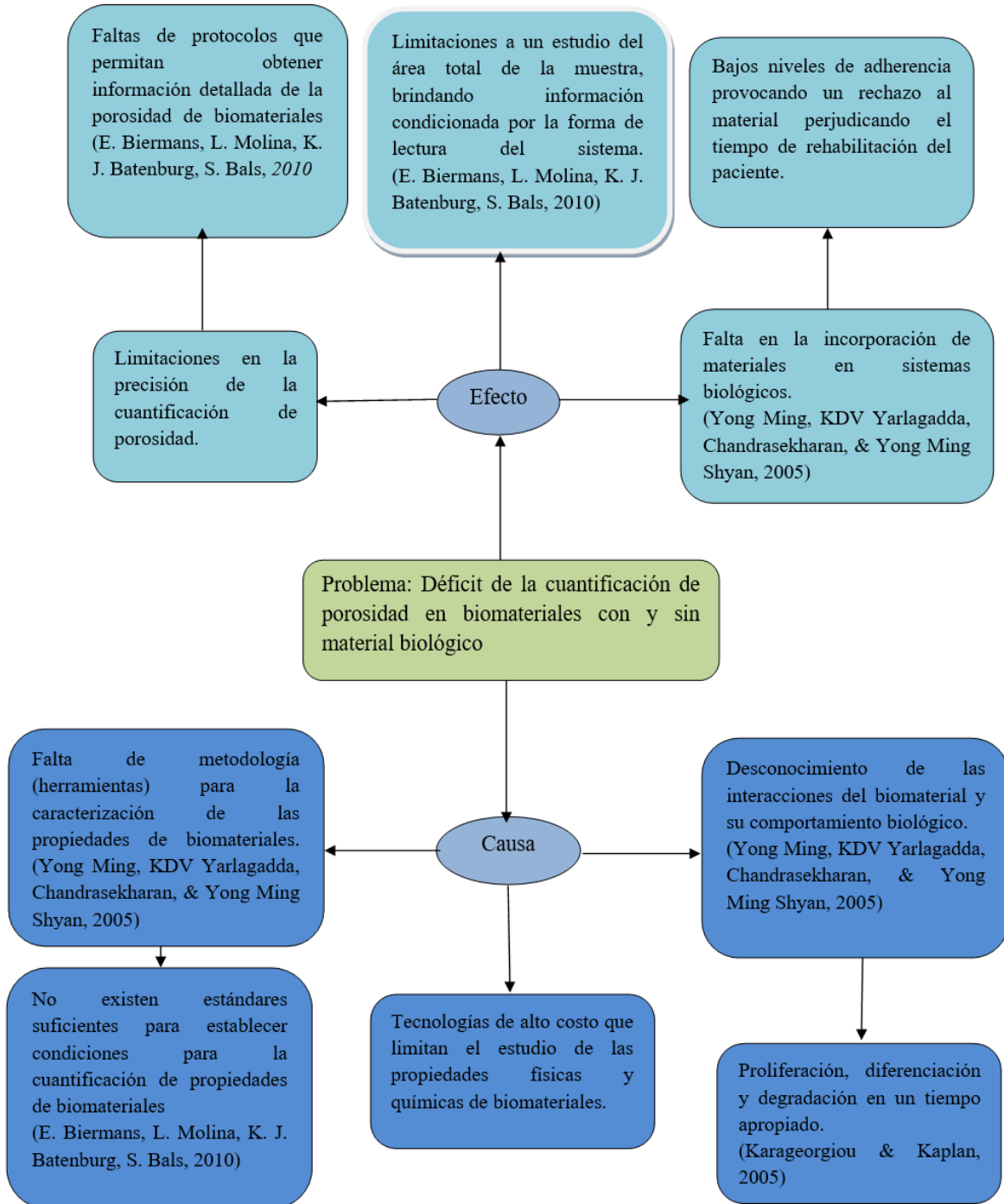
*Fuente. Tomado de (Ji-ru et al., 2004).*

En la *Ilustración 1* se muestra las características de procesamiento en imágenes de una ECO-material mediante microscopia electrónica de barrido como se observa la parte **a** la imagen original del tipo de la muestra, en la parte **b** se observa cómo se tiene en cuenta los detalles en porosidad iniciales al binarizar la imagen, en la **c** se aumenta el brillo de la imagen dejando únicamente la características de porosidad más grandes de la imagen y en su parte **d** se oscurece la imagen logrando observar mejores detalles de porosidad en la imagen. Este proceso se busca desarrollar en el algoritmo implementado para este proyecto debido a que una base de detección por tres diferentes contrastes lograra dan una mayor cantidad de destalles dentro de la imagen a estudiar (Ji-ru et al., 2004).

A nivel mundial existen diferentes entidades para normalizar y controlar las características mínimas del uso de los biomateriales para reemplazo, algunas entidades encargadas de esto son *International Organization for Standardization* (ISO), *Norma técnica colombiana* (NTC), *American Dental Association* (ADA) y *American Society for Testing and Materials* (ASTM). Estas entidades se encargan de aprobar o rechazar los distintos tipos de materiales que se usan en implantes dentales, regeneración ósea y remplazo tisular; un claro ejemplo es en la ASTM esta entidad cuenta con un programa encargado de la normalización de materiales quirúrgicos, ingeniería de tejidos e instrumentación médica para el uso y medidas de estos materiales, este grupo se denomina comité F04, que se fundó en 1962 el cual actualmente cuenta con un aproximado de 250 normas y estas normas se publican anualmente con sus actualizaciones (ASTM, 2015a; ICONTEC(NTC), 2015; ISO, 2015).

## 1.2 Planteamiento del problema

Ilustración 2 Árbol de problemas cuantificación de porosidad en biomateriales.



Fuente.(E. Biernmans, L. Molina, K. J. Batenburg, S. Bals, 2010; Karageorgiou & Kaplan, 2005; Yong Ming, KDV Yarlagadda, Chandrasekharan, & Yong Ming Shyan, 2005).

### 1.3 Descripción y justificación

Actualmente en el uso de materiales para reemplazo de tejidos cutáneos, óseos e incluso en tratamientos orales se emplean elementos aptos para este tipo de procedimientos, en muchos casos estos tienen una funcionalidad provisional o permanente en el paciente según sea el diagnóstico brindado por el profesional de la salud. El diagnóstico médico establece el tiempo necesario de estancia del material en el cuerpo; en caso de que sean de manera provisional, una reducción en el tiempo de estadía se verá reflejado como un beneficio en la calidad de vida del paciente (Yarlagadda, 2005). Por otra parte, si el material debe mantenerse de manera permanente este, al igual que en el caso anterior, debe contar con propiedades físicas, químicas y biológicas que le permitan adecuarse al ambiente biológico en el que se encuentran, deben ser biocompatibles y ser capaces de integrarse como parte del sistema fisiológico, permitiendo el flujo de nutrientes, tolerando el crecimiento y desarrollo interno de células (ASTM, 2015a; Snyder & Helmus, 2004).

En los procesos productivos a nivel industrial de biomateriales se debe realizar estudios mecánicos, químicos y físicos con el objetivo de evaluar la eficiencia y eficacia del material, sin embargo, en el estudio físico se presentan limitaciones debido a que en este tipo de pruebas se analiza el biomaterial en condiciones iniciales de uso sin obtener información detallada de los cambios físicos y químicos que sufre al estar en el ambiente biológico en el cual tendrá su aplicación. Un ejemplo de esto es que para los ensayos en la evaluación de la porosidad, no se tiene en cuenta el cambio de esta propiedad física al momento de entrar en contacto con células vivas que intentarán integrar el biomaterial al cuerpo, modificando su morfología y estructura tridimensional para adecuarlo como un sitio de proliferación celular. Además de esto actualmente no se cuenta con una metodología de cuantificación para esta propiedad en condiciones biológicas (B.L. Seala, T.C. Oterob, & A. Panitch, 2001; Navarrete, 2014). Al no tener en cuenta estos factores, se corre el riesgo de la pérdida de funcionalidad del biomaterial en el organismo, generando complicaciones en el tratamiento de pacientes que necesitan un procedimiento de rehabilitación. Por el contrario, al cumplir con este tipo de requerimientos el material logrará una mayor bioactividad y biocompatibilidad que implica un menor tiempo de tratamiento. (Navarrete, 2014).

Algunos de los métodos directos como en la cuantificación por medio de registro sónico y en la porosimetría de mercurio se generan alteraciones estructurales y químicas del material por condiciones del método a las cuales son sometidos como son sustancias químicas, vibraciones generadas en el ultrasonido y cargas eléctricas (Navarrete, 2014).

En los resultados de estudio de las muestras obtenidas por SEM también existe la posibilidad de alteración química mediada por sustancias, en este caso, las sustancias se sumergen en oro para generar un reflejo del haz de luz que permitirá el estudio del material, sin embargo, en caso de haber presencia de material biológico en la muestra, este se va a ver afectado por esta sustancia (Ji-ru et al., 2004).

Un estudio *in vitro* es un método en el cual las reacciones o procesos tienen lugar en un ambiente artificial fuera del organismo vivo (PubMed - MeSH, 2015). En este estudio se

emplean cultivos de células de tejidos, órganos y muestras biológicas para caracterizar el comportamiento y lograr una simulación en un ambiente controlado de estos organismos sobre el medio seleccionado. Emplear esta metodología para la evaluación del comportamiento celular sobre un biomaterial permite relacionar las características de la respuesta biológica de organismos celulares al entrar en contacto con materiales de esta naturaleza. Es por esto, que realizar estudios previos permite la clasificación del tipo de material que se desea emplear en la regeneración y sustitución de tejidos, evitando así procesos de implantación de materiales no aptos que pueden generar problemas en la calidad de vida de los pacientes (Albaladejo A., 2008; Ríos H et al., 2001).

Con lo anterior se plantea la pregunta del trabajo ¿Que método se puede implementar para la medición de porosidad evitando la alteración del material biológico y que además permita medir la porosidad y su cambio antes y después del cultivo?.

De esta manera se propone un método indirecto como solución a esta problemática, empleando un análisis de imágenes obtenidas por microscopia óptica y microscopia electrónica de barrido. Este método desarrollado, además de no emplear sustancias externas sobre el material que afecten la composición del mismo, ofrece una accesibilidad mayor respecto a otros métodos, pues debido a su versatilidad y precisión, no necesita de grandes herramientas para su ejecución así como tampoco grandes conocimientos en programación ni en Matlab por parte del usuario, además de brindar una gran confiabilidad en los resultados lo que permite su empleo para investigaciones de diferente naturaleza (Abramowitz, Davidson, & Abramowitz, 2008).

## 2 Estado del arte

### 2.1 Fundamentación teórica

#### 2.1.1 Marco teórico- conceptual

La ingeniería tisular es un área multidisciplinar para el desarrollo y crecimiento de moléculas, células, tejidos u órganos empleados para la sustitución o reemplazo de las funciones de partes del cuerpo defectuosas o lastimadas aumentando la calidad de vida de los pacientes. Esta rama de la ingeniería está involucrada con un gran número de disciplinas médicas, técnicas e ingenieriles con conocimientos en biomateriales, células, biomoléculas, biomecánica, diseño e informática para apoyar la investigación de información relacionada (Borko Furht & Ankur Agarwal, 2013). Su fundamento se basa en la manipulación de celular vivas y de entornos celulares, combinándolos con materiales y componentes con el objetivo de emplearlos en tratamientos para reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o un tejido.

La pérdida parcial o total, así como el fallo en las funciones fisiológicas de tejidos u órganos es uno de los problemas actuales con más impacto en la sociedad. En el tratamiento de este tipo de alteraciones, las cirugías reconstructivas y de trasplante son las formas más requeridas para tratar a estos pacientes, en ésta, se emplean órganos que en su mayoría son donados y aunque esta práctica tiene un incremento en su demanda, se ve limitada por la baja cantidad de donantes. Es por esto que la comunidad científica ha realizado grandes esfuerzos durante las últimas décadas para lograr resolver estos trastornos de manera más eficiente, para esto, se han visto avances en disciplinas como la biología molecular y celular, la bioquímica y la tecnología logrando impulsar el campo de la ingeniería tisular. (Abramowitz et al., 2008; Gentile, Chiono, Carmagnola, & Hatton, 2014).

De allí la importancia de comprender qué es un biomaterial, el cual se entiende como una combinación de elementos o compuestos diseñados para interaccionar con sistemas biológicos y ser implementados en seres vivos. (Winkle, 2010). Según la conferencia de conceso del Instituto de Salud norteamericano (NIH) sobre aplicaciones clínicas de biomateriales define un biomaterial como: *“Cualquier sustancia diferente a un fármaco, o combinación de sustancias con origen sintético o natural, que pueden ser utilizadas durante cualquier periodo de tiempo, como un sistema o parte de un sistema, que trata, aumenta, o reemplaza cualquier tejido, órgano o función del cuerpo”*(E. Biermans, L. Molina, K. J. Batenburg, S. Bals, 2010).

Debido a que estos elementos son empleados en la sustitución, reemplazo parcial o total de tejidos, evaluación de procesos metabólicos y tratamiento de algunas disfuncionalidades fisiológicas y anatómicas de sistemas biológicos, es esencial conocer sus propiedades, funciones y estructura los cuales son aspectos de gran importancia para una adaptación mecánica y biológica con el ambiente al que sea expuesto. Gracias a nuevas tecnologías se ha conseguido mejorar sus características por medio del estudio de sus propiedades, modificándolas de tal manera que logran una mejor integración(Winkle, 2010).

Existen dos tipos de biomateriales según su naturaleza de origen: biológicos y sintéticos. Los biomateriales biológicos son aquellos que provienen directamente de un ser vivo por ejemplo el colágeno purificado, las fibras proteicas (seda, lana...), celulosa, glucosalina entre otros. Estos se pueden diferenciar en dos categorías: blandos (*soft-tissue replacement*) y duros (*hard-tissue replacement*), los blandos se emplean para sustituciones de uso cardiovasculares (catarses, válvulas cardíacas y prótesis vasculares), diseño de órganos (corazón y riñón artificiales, regeneradores de piel, máquina corazón-pulmón), los duros tienen aplicaciones dentales y ortopédicas (reemplazos articulares, medios de fijación para fracturas, reparación de defectos óseos, tendones y ligamentos artificiales, fijación de piezas dentales). (Ratne, Hoffman, & Schoen, 1996) Los biomateriales sintéticos pueden ser metálicos, cerámicos o polímeros de acuerdo a su disposición molecular (Otero, 2008).

Según la necesidad del material a implantar, el lugar y las características del medio, en la actualidad se han desarrollado tres principales clases de biomateriales para implantes empleados en la medicina: *biometales*, *biocerámicas*, y *biopolímeros*. En este caso se va a hacer referencia a los últimos dos debido a que son el centro de estudio de este proyecto de investigación (Otero, 2008).

Las *biocerámicas* son materiales inorgánicos, no metálicos, con enlaces iónicos o iónico-covalente que están conformadas a partir de polvo consolidado por sinterización. Estas cerámicas son materiales duros, con unas propiedades tensionales relativamente pobres pero presentan una fuerza a la compresión excelente, así como una gran resistencia al desgaste con propiedades de baja fricción en articulación. Una cerámica que en su construcción disponga de baja densidad y gran porosidad, provee de una interfaz mayor para la vascularización y el crecimiento óseo (Otero, 2008). Existen cerámicas naturales como el cuarzo, la piedra imán, el topacio, el corindón, y las piedras preciosas. También pueden ser cerámicas sintéticas como la alúmina, las ferritas, el carburo de silicio, los transistores, los aislantes eléctricos entre otros. (Claudia I. Guevara, Gloria Romero de Pérez, 2006). Pueden clasificarse según su estructura física en sólidos cristalinos, policristalinos por chorro de plasma y sólidos amorfos, y según su composición química en óxidos cerámicos, biovidrios y fosfato de calcio (Muratore Moreno & P Rodríguez Alvarez, 2003).

El motivo por el que las biocerámicas son tan empleadas en la biomedicina principalmente en implantes dentales, hueso y componentes de válvulas cardíacas, radica en el hecho en que éstas son químicamente inertes, no generan respuestas no deseadas en el tejido en el que se implantan, y no son susceptibles de ataque microbiano. Entre las cerámicas más utilizadas se encuentran la alúmina (óxido de aluminio), la Hidroxiapatita (fosfatos cálcicos, como por ejemplo  $[Ca^3 (PO_4)_2]^3Ca (OH)_2$ ), diferentes formas de carbono y los denominados biovidrios (cuya composición se basa en  $SiO_2$ -  $CaO$  -  $Na_2O$  -  $P_2O_5$  y algunos que contienen  $MgO$  y  $K_2O$ ) (Lizarbe, 2007).

Según la base de datos MESH del Instituto de Salud norteamericano (NIH) los *biopolímeros* son “Compuestos formados por unidades más pequeñas habitualmente repetidas unidas por enlaces covalentes, estos compuestos forman con frecuencia grandes macromoléculas (*biopolímeros*, *plásticos*)” (E. Biermans, L. Molina, K. J. Batenburg, S. Bals, 2010). Este tipo de materiales son derivados del petróleo y se caracterizan por la baja

resistencia térmica, cuando un material termoplástico se somete a altas temperaturas se puede fluidificar y solidificar posteriormente al ser expuesto a temperaturas bajas, esto quiere decir que este tipo de polímeros tienen la capacidad de reformarse hasta cierto punto tras su fabricación. Por otra parte, los materiales termoestables no sufren fluidificación al ser expuestos a altas temperaturas, debido a esto una vez fabricados estos no pueden reformarse sin destruir su estructura (Otero, 2008). Las propiedades físicas y la estabilidad química de estos biomateriales dependen de un conjunto de propiedades como la composición química del polímero y de su grado de entrecruzamiento. Éstos son muchos más blandos que los metales, y ofrecen un mejor aislamiento que las cerámicas, sin embargo esto está condicionado por las condiciones térmicas al que estén expuestos, por ejemplo, a bajas temperaturas es más conveniente emplear un material polimérico, mientras que a temperaturas altas es más apropiado utilizar biocerámicas (Duffo, 2011; Lizarbe, 2007).

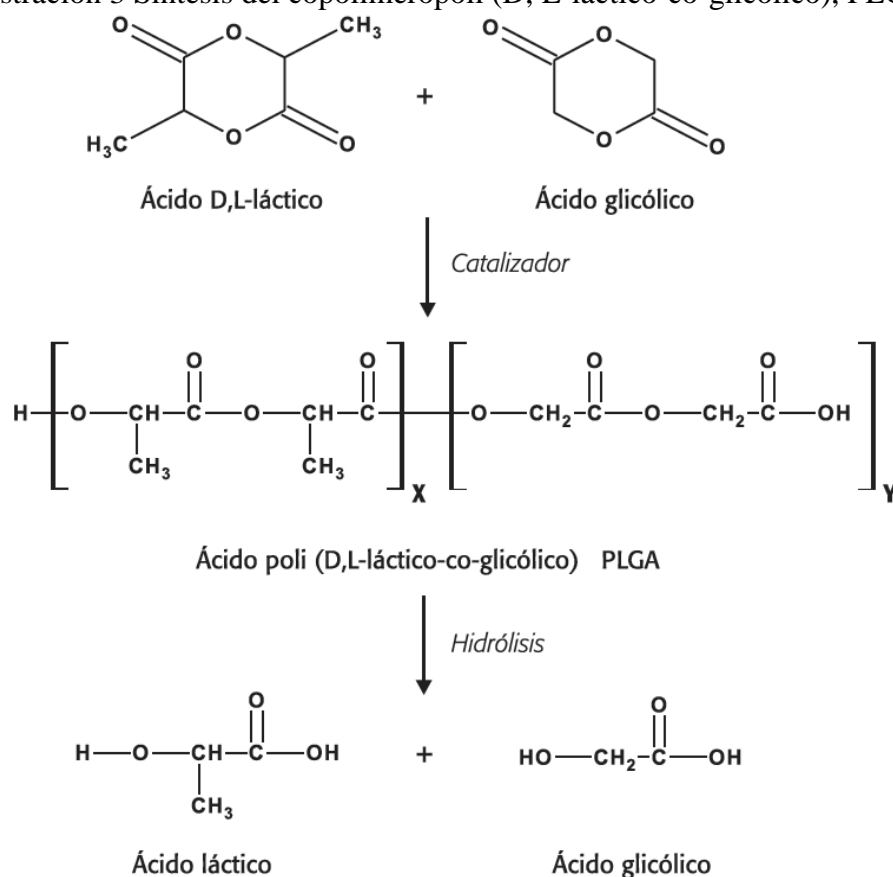
Gran parte del éxito del uso de los biopolímeros en aplicaciones médicas se encuentra en el hecho de que éstos pueden ser fabricados u obtenidos de diferentes formas, por lo que pueden ser empleados en la conformación de fibras, películas, tejidos o bloques. Pueden ser de origen natural o sintético. Los de origen natural (como el colágeno, celulosa, almidón, caucho natural, ácidos nucleicos) provienen directamente de la naturaleza, los sintéticos son materiales obtenidos como resultado de modificaciones mediante procesos químicos como la polimerización, proceso controlado por el hombre a partir de materiales de bajo peso molecular. (Duffo, 2011; Otero, 2008). Los poliésteres son materiales sintéticos derivados de los polímeros que surgen a partir de la polimerización de un hidrocarburo de determinado estireno y de otros químicos. Al ser una resina que posee una gran resistencia a diversos agentes químicos y la humedad, tiene la facilidad de ser utilizada en la elaboración de diversos productos. Aunque estos han sido tradicionalmente utilizados en la industria textil, también se han empleado como materiales biodegradables sintéticos, principalmente en suturas quirúrgicas. Actualmente en el campo de la salud, los poliésteres son empleados como sistemas inyectables para la liberación controlada por su biodegradabilidad, falta de toxicidad, biocompatibilidad entre otras características que hacen de este tipo de polímeros una alternativa a los tradicionales materiales empleados en este campo (Claudia I. Guevara, Gloria Romero de Pérez, 2006; Lizarbe, 2007).

### 2.1.2 *Poli (D, L-lactico-co-glicolico) (PLGA)*

El Poli (D, L-lactico-co-glicolico) o PLGA, es un copolímero de tipo poliéster formado por las unidades monoméricas de ácido láctico (PLA) y de ácido glicólico (PGA) (Pedraz, 2007). Este compuesto se sintetiza por medio de la apertura del anillo por una reacción de copolimerización de dos monómeros, los dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5-diones) de ácido glicólico y ácido láctico (Ilustración 3). Durante la reacción, las unidades monoméricas se unen entre sí mediante enlaces tipo éster (Claudia I. Guevara, Gloria Romero de Pérez, 2006). Las diferentes formas que el PLGA puede ser obtenido de acuerdo a las diferentes proporciones de monómeros lácticos y glicólico durante el proceso de polimerización. Una de las ventajas que presenta este polímero es que se puede ser procesado en casi cualquier forma y tamaño. Es soluble en una amplia gama de disolventes, incluyendo disolventes clorados, tetrahidrofurano, acetona o acetato de etilo. En agua, se

degrada por hidrólisis de sus enlaces éster. (Ilustración 3) (Makadia & Siegel, 2011). Como ya se mencionó anteriormente, esta propiedad de solubilidad está sujeta a las proporciones de sus monómeros, en las cuales una mayor presencia de PLA hace que sea más hidrófobo que PGA con una excepción en la proporción 50:50 de PLA/PGA, por el contrario si hay una mayor cantidad de PGA el biomaterial será menos hidrófilo, absorberá menos agua y por lo tanto se degradará más lentamente. El grado de cristalinidad y punto de fusión de los polímeros están directamente relacionados con el peso molecular del polímero. La Tg (temperatura de transición vítrea) de los copolímeros de PLGA se informó ser superior a la temperatura fisiológica de 37 ° C y por lo tanto son vítreos en la naturaleza, exhibiendo así una estructura de cadena bastante rígida (Makadia & Siegel, 2011).

Ilustración 3 Síntesis del copolímero poli (D, L-láctico-co-glicólico), PLGA.



*Fuente. Tomado de (Rosas & Pedraz, 2007).*

Gracias a estas configuraciones de cadenas, el PLGA cuenta con una gran capacidad de adaptar sus propiedades al tejido receptor y de mostrar una gran versatilidad para el crecimiento y desarrollo celular (Rosas & Pedraz, 2007).

Por a las condiciones de fabricación y la facilidad que le permite ser sintetizado con diferentes proporciones de sus monómeros abre una posibilidad de controlar el tiempo de degradación del polímero lo que proporciona a este biopolímero la posibilidad de ser



empleado en la preparación de una gran variedad de dispositivos biomédicos como injertos, suturas, implantes, prótesis etc. Aprobado por la *Food and Drug Administration (FDA)*, su principal uso ha sido en la elaboración de sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral (Claudia I. Guevara, Gloria Romero de Pérez, 2006; Gentile et al., 2014).

Otras de las propiedades mecánicas de gran importancia son su módulo elástico, ductilidad, y resistencia mecánica debido a que este biomaterial tiene aplicaciones como implantes y suturas, por lo que va a estar en trabajo frente a diferentes tipos de fuerzas que pueden ir desgastando el material. Algunas de estas propiedades se pueden ver en la *Tabla 2*.

*Tabla 2 Propiedades mecánicas del PLGA*

<b>Propiedad</b>	<b>Limites</b>	<b>DLPLA/PG A 50/50</b>
$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	Superior	1,3
	Inferior	1,4
$\sigma$ (MPa)	Superior	41,4
	Inferior	55,2
E (GPa)	Superior	1
	Inferior	4,34
$\epsilon$ (%)	Superior	2
	Inferior	10
Tg (°C)	Superior	40
	Inferior	50
Tm (°C)	Superior	amorfo
	Inferior	

*Fuente. Tomado de (Van de Velde & Kiekens, 2002).*

La densidad ( $\rho$ ), el límite elástico ( $\sigma$ ), el módulo de Young (E), la deformación máxima ( $\epsilon$ ), el límite elástico y el módulo de Young divididos por la densidad del biopolímero ( $\sigma$  y E, respectivamente), la temperatura de transición vítrea (Tg) y la temperatura de fusión (Tm).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la finalidad principal de un biomaterial es entrar en contacto con un sistema biológico, es por esto que este debe contar con unas propiedades biológicas, físicas y químicas.

Cuando un material es implantado en el organismo de cualquier ser vivo, este debe tener unas propiedades biológicas aptas para que se le permita una adaptación al nuevo sistema con la finalidad de ser compatible y aceptado como parte del medio. El conocimiento de estas propiedades tiene una gran utilidad para poder anticipar el comportamiento *in vivo*. Estas propiedades básicas se evidencian como (Lizarbe, 2007):

- a. Biocompatibilidad, es decir, ser aceptado por el organismo y que este último no desarrolle ni provoque sistemas de defensa para eliminarlo del medio.
- b. No presentar tasas de toxicidad ni ser carcinógeno.
- c. Ser químicamente estables, esto incorpora la capacidad de biodegradarse sin producir agentes químicos.
- d. Presentar propiedades mecánicas óptimas al igual que características en su estructura superficial e interna.
- e. El tamaño, su diseño y su forma de implante deben ser adecuados.

La biodegradación es una propiedad que le permite a un biomaterial ser descompuesta en un tiempo estimado llevado a cabo por acción celulares, metabolismos y por mecanismos físico-químicos del medio donde este se encuentre. Esta biodegradación puede darse principalmente por la acción enzimática y la degradación química la cual ocurre en dos pasos, el primero de ellos es la disminución de su masa molecular mediante reacciones bióticas o abióticas seguido de una limpieza o eliminación de los fragmentos restantes de los procesos dados generalmente por las rutas metabólicas del organismo. Hay que tener en cuenta que este proceso está sujeto a factores del polímero como su origen de fabricación, peso molecular, morfología. En casos en que el biomaterial sea empleado en aplicaciones médicas, esta biodegradabilidad supone un avance importante ya que evitara una cirugía para eliminar el material del cuerpo (Duffo, 2011; Ghanbarzadeh & Almasi, 2013).

Para el caso del PGLA, al entrar en proceso de biodegradabilidad, sus propiedades químicas le permiten biodegradarse por medio de hidrolisis. Una vez disminuido su peso molecular, sus componentes monoméricos son removidos por medios naturales. El PGA es convertido en metabolitos o eliminado por otros mecanismos, y el PLA puede ser eliminado a través del ciclo ácido tricarboxílico (Gentile et al., 2014).

Sin embargo, cuando el biomaterial no es completamente tolerado por el organismo, es debido a tres posibles causas (Otero, 2008):

- a. Es un material Bioinerte, esto querer decir que este tiene una interacción mínima o en ocasiones nula respecto al tejido circundante.
- b. No sea un material Bioactivo, estos materiales tienen una interacción con el tejido en circundante, dependiendo del tiempo en contacto.
- c. No sea un material completamente Bioabsorbible, es decir, que este material no tiene la facilidad de disolverse y ser lentamente reemplazados frente al tejido.

Debido al constante proceso de pérdida de masa molecular del biomaterial al entrar en un proceso de biodegradación, se van a ver afectadas las propiedades físicas y mecánicas de este, debido a esto es de gran importancia tener una evaluación mecánica del material. Las

propiedades físicas incluyen peso molecular, cristalinidad, peso molecular, temperaturas de fusión y transición vítrea (Gentile et al., 2014).

El peso molecular juega un papel importante en la degradación del biopolímero lo que también está relacionado con el aumento de su viscosidad al adherirse a un solvente, para el PLGA en una proporción 50:50 parte desde 10 – 20 a 100 kDa, de acuerdo a esto se estima que el tiempo de degradación del biomaterial será de algunas semanas a meses. De acuerdo a la proporción de PLA y PGA va a hacer del material sintetizado más o menos hidrófilo, si el contenido de PLA es mayor, será menos hidrofílico, absorberá menos agua teniendo una degradación más tardía como consecuencia de la presencia de grupos metil (Gentile et al., 2014; Rosas & Pedraz, 2007).

La organización de las cadenas poliméricas de formación del material define la cristalinidad del mismo, dependiendo de su estructura y formación molecular, la temperatura y la tasa de enfriamiento durante su proceso de solidificación, afectando la flexibilidad y la movilidad de las cadenas moleculares (Athanasiou, Agrawal, Barber, & Burkhart, 1998).

### 2.1.3 Normas ASTM e ISO estándares de desarrollo en metodologías de cuantificación de porosidad.

*Tabla 3 Normas ASTM e ISO para medición de porosidad en materiales.*

ASTM	F2451-05	<i>Standard Guide for in vivo Assessment of Implantable Devices Intended to Repair or Regenerate Articular Cartilage</i>
	F1854-15	<i>Standard Test Method for Stereological Evaluation of Porous Coatings on Medical Implants</i>
ISO	4793:1980	<i>Laboratory sintered (fritted) filters -- Porosity grading, classification and designation</i>
	10545-3:1995	<i>Ceramic tiles -- Part 3: Determination of water absorption, apparent porosity, apparent relative density and bulk density</i>
	14610:2012	<i>Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) -- Test method for flexural strength of porous ceramics at room temperature</i>

ISO 4793:1980 *Laboratory sintered (fritted) filters -- Porosity grading, classification and designation*. Esta norma internacional especifica un sistema de clasificación de porosidad, clasifica y designa filtros sintetizados en el laboratorio dando un índice de tamaño del poro. Es aplicable a filtros de laboratorio hechos de vidrio, sílice vítrea, cerámica, metales y materiales plásticos (ISO International, 2010).

ISO 10545-3: 1995 nombrada *Ceramic tiles -- Part 3: Determination of water absorption, apparent porosity, apparent relative density and bulk density*, se especifica los métodos para la determinación de la absorción de agua, porosidad aparente, densidad relativa aparente y la densidad aparente de las baldosas cerámicas. Hay dos métodos de obtención de impregnación con el agua de los poros abiertos de las muestras(ISO internacional, 2014).

ASTM F2451-05 *Standard Guide for in vivo Assessment of Implantable Devices Intended to Repair or Regenerate Articular Cartilage* se cubren las directrices generales para la evaluación *in vivo* de depósitos implantables destinados para reparar o regenerar cartílago general. Los dispositivos incluidos en esta guía pueden estar compuestos de biomateriales naturales o sintéticos (biocompatibles y biodegradables) en donde estos pueden contener células o agentes biológicamente activos, como factores de crecimiento, péptidos sintéticos, plásmidos o cDNA(ASTM, 2010).

ISO 14610:2012 *Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) -- Test method for flexural strength of porous ceramics at room temperature*, en esta norma describe un método ensayo para la determinación de la resistencia a la flexión de la cerámica fina porosa en aire a temperatura ambiente(ISO internacional, 2012).

ASTM F1854-15 *Standard Test Method for Stereological Evaluation of Porous Coatings on Medical Implants*. se menciona algunos métodos para la cuantificación de las propiedades morfológicas de revestimiento poroso unido a sustratos sólidos, en este, se realiza una estimación estadística de las distribuciones de espesor de revestimiento de la media y el porcentaje de volumen vacío. Este método puede ser sustituido para revestimientos cerámicos si una sección transversal puede ser producida(ASTM, 2015b).

#### 2.1.4 Repetibilidad y reproducibilidad ( $r$ & $R$ )

Repetibilidad de medición ( $r$ ) de acuerdo con el VIM (Vocabulario Internacional de Metrología): *La repetibilidad de resultados de mediciones es: La proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo las mismas condiciones de medición. Dónde: (1) Estas condiciones son llamadas condiciones de repetibilidad. (2) Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento de medición, el mismo observador, el mismo instrumento de medición, utilizado bajo las mismas condiciones, el mismo lugar, repetición en un periodo corto de tiempo. (3) La repetibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de la dispersión característica de los resultados*(Guzman, 2003).

Reproducibilidad de medición ( $R$ ) de acuerdo con el VIM es: *La proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo condiciones de medición que cambian. Dónde: (1) Una declaración válida de reproducibilidad requiere que se especifique la condición que cambia. (2) Las condiciones que cambian pueden incluir: principio de medición, método de medición, observador, instrumento de medición, patrón de referencia, lugar, condiciones de uso, tiempo. (3) La reproducibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de la dispersión*

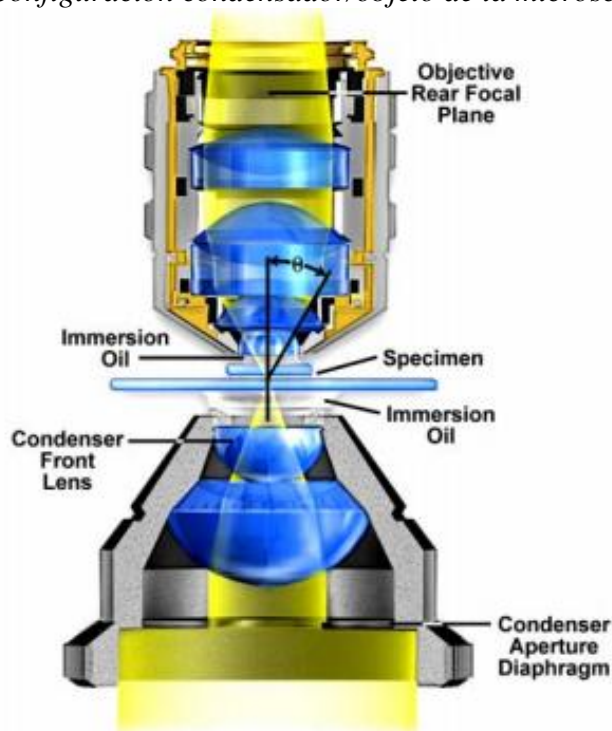
*característica de los resultados. (4) Se entiende que los resultados usualmente son resultados corregidos (Guzman, 2003).*

### *2.1.5 Microscopia óptica*

La microscopia óptica (MO) es una técnica empleada por múltiples disciplinas para observar estructuras que no son visibles a simple vista. En este sistema se refractan los rayos luminosos para proporcionar una imagen final de mayor tamaño, invertida y virtual (Eynard, Valentich, & Rovasio, 2008). Dos parámetros importantes en la microscopia son la magnificación y el poder de resolución. La magnificación es la relación que se establece de la imagen obtenida con el objeto en tamaño real. El poder de resolución es una medida que se establece entre dos puntos de tal manera que se puedan distinguir dos elementos separados. Al igual que el ojo humano, los microscopios ópticos tienen la capacidad de magnificar objetos tantas veces como sea posible, sin embargo estos tienen un límite establecido aproximadamente en  $0,2\ \mu\text{m}$  o  $200\ \mu\text{m}$  (Campbell & Reece, 2007).

En el microscopio óptico, la luz generada en la lámpara pasa a través de un condensador para luego pasar a través y alrededor de la muestra, *Ilustración 4*, esta luz es llamada “luz directa” o “luz no obstaculizada”. La luz de fondo que pasa alrededor de la muestra es también una luz no obstaculizada. La otra porción de la luz direccionada al objeto, sufre una desviación al pasar en medio del material, pues su haz de luz choca con algún componente sólido, este es llamado “luz difractada”, la cual sufre un desfase de  $180^\circ$  respecto a la luz no desviada. La mitad de esta longitud de onda desfasada genera una interferencia destructiva con la luz directa cuando las dos llegan a un plano intermedio de la imagen generada por el diafragma del ocular. Estos lentes magnifican la imagen obtenida la cual será proyectada en la retina, el plano de lectura de la cámara o la superficie sensitiva del computador. Como estos componentes son sensibles a las variaciones de brillo, la imagen se va a ver con partes más oscuras que otras, permitiendo reconstruir una imagen de la muestra original (Abramowitz et al., 2008; Douglas B. Murphy, 2001).

*Ilustración 4 Configuración condensador/objeto de la microscopia óptica*



(Abramowitz et al., 2008).

En la ilustración 4 se muestra un haz de luz generado desde la parte de abajo, el cual es comúnmente llamado microscopio de luz inversa, el cual muestra los trazos de los rayos de luz visible a través del objeto del microscopio (Abramowitz et al., 2008).

En el momento de realizar una toma de imágenes mediante la microscopia óptica es necesario tener en cuenta el grosor de la muestra, el tipo de lente que se utiliza para hacer la toma, es decir, el acercamiento que se maneje, ya sea de 10X o 10000X, y se busca tener una superficie lisa en su mayoría en su parte de muestreo debido a que se busca una buena resolución de la imagen y si esta no tiene que ser simétricamente plana en su superficie es posible que se obtengan puntos desenfocados y estos crean un margen de error superior al deseado. Lo que se puede hacer en estos casos es tratar la muestra o enfocar la imagen en un punto diferente (Abramowitz et al., 2008).

#### *2.1.6 Algoritmo y análisis de imágenes*

Un algoritmo se define como una sucesión ordenada y finita de instrucciones que representan un modelo de solución para un problema. Para realizar un algoritmo es conveniente el diseño y definición previa, los cuales se muestran independientes de los lenguajes de programación; Estos algoritmos son la infraestructura de cualquier solución, transcrita en cualquier lenguaje de programación. Estos cumplen una serie de características dentro de las que destacan: precisión, debe estar bien definido, debe ser finito y siempre debe producir un resultado (Gil & Quetglás, 2003; Knuth, 1980).

El análisis digital de imágenes es una técnica en la cual se obtiene información de una imagen representada gráficamente. En éste, los datos son en su mayoría numéricos. Tiene aplicaciones como en la astronomía en la cual se emplea para medir la distancia entre estrellas tomadas por telescopios, así como en neurociencias se aplica a la medición de parámetros para la medición de diámetros y perímetros de neuronas (Gil & Quetglás, 2003; Knuth, 1980).

## 2.2 *Estado de la técnica*

### 2.2.1 *ImagenJ*

Es un programa de procesamiento de imágenes de Java. En él se puede calcular estadísticas de la zona y el valor de pixel de definidas seleccionadas por el usuario, permite la medición de distancias y ángulos, así como la creación de histogramas de densidad y gráficos de perfil. Es compatible con las funciones de procesamiento de imágenes estándar, tales como la manipulación de contraste, nitidez, suavizado y detección de bordes y la mediana de filtrado. Realiza transformaciones geométricas tales como escalamientos y rotaciones. Dispone de un Zoom de imágenes de hasta 32:1 y 1:32, en las cuales están disponibles todas las herramientas. El programa es compatible con cualquier número de ventanas (imágenes) al mismo tiempo, limitado sólo por la memoria disponible. La calibración espacial está disponible para proporcionar mediciones dimensionales del mundo real en unidades tales como milímetros. Densidad o de calibración de escala de grises también está disponible (ImageJ, 2007).

Se puede visualizar, editar, analizar, procesar, guardar e imprimir imágenes de 8 bits, 16 bits y 32 bits. Puede leer formatos de imagen incluyendo TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS y RAW. Es compatible con "stacks", una serie de imágenes que comparten una sola ventana. Es multipropósito, es decir, soporta el manejo de lectura de imágenes en paralelo con otras operaciones (ImageJ, 2007).

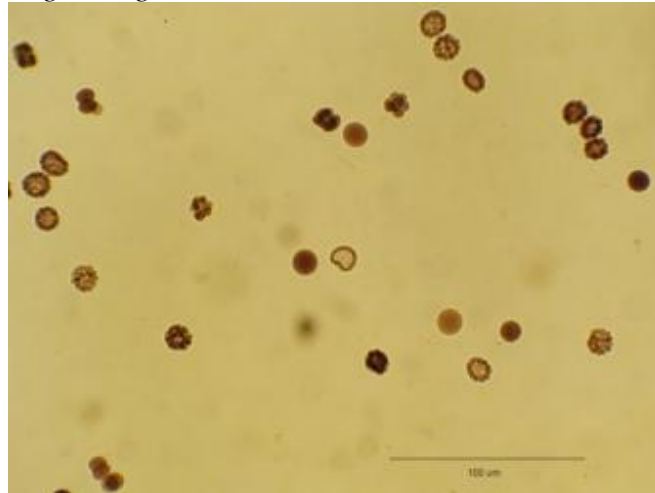
ImageJ fue diseñado con una arquitectura abierta que proporciona extensibilidad a través de los complementos de Java. El análisis y procesamiento de los plugins se pueden desarrollar utilizando ImageJ construido en el editor y por medio del compilador de Java. Los manuales escritos para el usuario hacen que sea posible resolver casi cualquier problema de procesamiento de imágenes o análisis (ImageJ, 2007).

A continuación se presenta un ejemplo de aplicación de las herramientas de ImageJ.

#### *Análisis y conteo de partículas*

Problema: Contar y determinar la distribución de una colección de embriones de equinodermos.

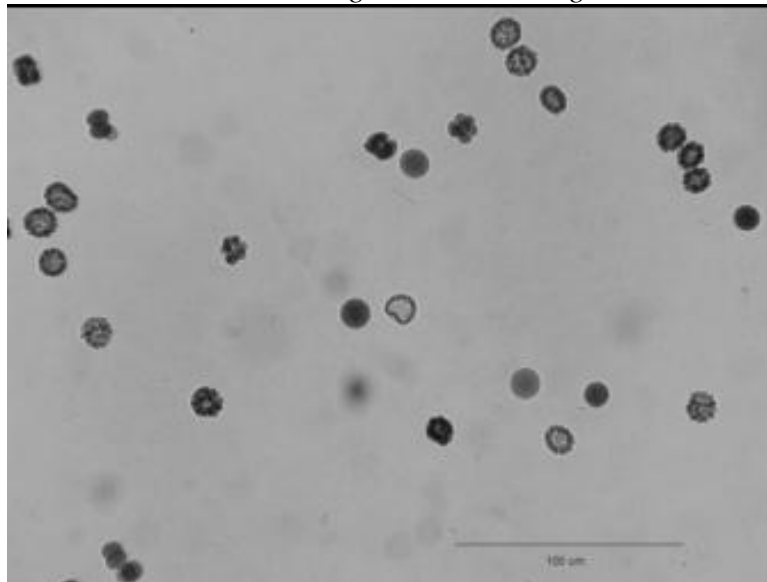
*Ilustración 5 Imagen original de la distribución de embriones de equinodermos.*



*Fuente. Tomado de (ImageJ, 2007).*

En la ilustración 5 se pueden visualizar la distribución de los embriones de equinodermos. En esta, se establece la escala de la ventana (en este caso 100) empleando la caja de “Unidad de mediciones” (ImageJ, 2007).

*Ilustración 6 Imagen en escala de grises.*

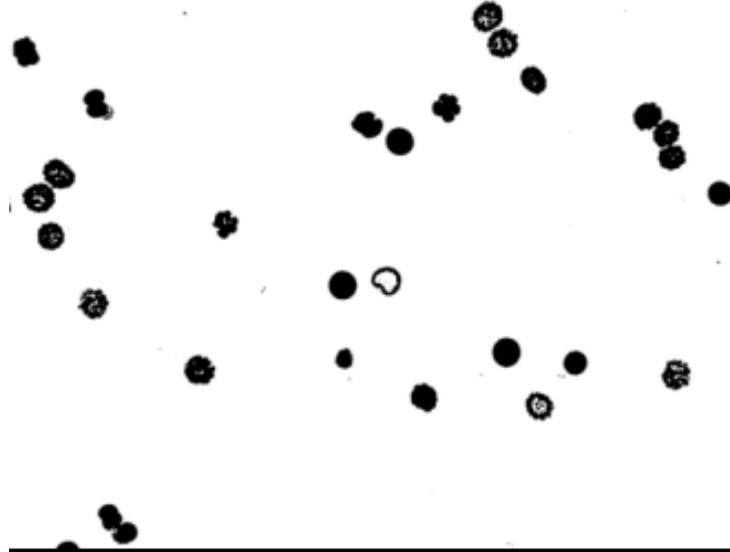


*Fuente. Tomado de (ImageJ, 2007).*

En la ilustración 6 se realizó una conversión a 8 bits, en la que se visualiza en una escala de grises.



*Ilustración 7 Transformación de la imagen a binario.*



*Fuente. Tomado de (ImageJ, 2007).*

En la ilustración 7 se emplea un umbral utilizando la herramienta automatizada que permita la conversión a valores binarios. Se rodea la barra de escala con una herramienta de selección rectangular para limpiar contenido (*edit -> limpiar*).

*Ilustración 8 Limpieza de contenido de las imagen.*



*Fuente. Tomado de (ImageJ, 2007).*

En la ilustración 8 se realiza un análisis de las partículas de la imagen, En esta, el usuario digita 20 como el mínimo de tamaño de las partículas. Se emplea la herramienta “Show Outlines” para limpiar el contenido interno de cada partícula. Veinticinco embriones son contados, numerados y dibujados. La ventana de visualización arroja los resultados en escala de ( $\mu\text{m}^2$ ) para cada embrión (ImageJ, 2007).

Los resultados se muestran en la ventana de visualización obteniendo:

Límite: 0-0  
Conteo: 25  
Total área:  $3177.6 \mu\text{m}^2$   
Tamaño promedio:  $127.1 \mu\text{m}^2$   
Área de fracción: 3.72%

### 2.2.2 ¿Qué es Matlab?

Matlab nace en los años 70, como una plataforma para el desarrollo de teoría de matrices, álgebra lineal y análisis numérico; el acrónimo MATLAB nace de “MATrix LABoratory”. Durante todo su desarrollo Matlab ha ido actualizando su plataforma volviéndose un programa con mucha fuerza y agradable al usuario, Matlab incluye herramientas de cálculo científico, técnico y visualización gráfica, así como también utiliza su propio lenguaje de alto nivel (Samira Hervella Azouzi., 2006).

MATLAB es un lenguaje de computación técnica de alto nivel y un entorno interactivo para desarrollo de algoritmos, visualización de datos, análisis de datos y cálculo numérico. Con MATLAB, podrá resolver problemas de cálculo técnico más rápidamente que con lenguajes de programación tradicionales, tales como C, C++ y FORTRAN(Samira Hervella Azouzi., 2006).

Se puede usar MATLAB en una amplia gama de aplicaciones que incluyen procesamiento de señales e imágenes, comunicaciones, diseño de sistemas de control, sistemas de prueba y medición, modelado y análisis financiero y biología computacional. Los conjuntos de herramientas complementarios (colecciones de funciones de MATLAB para propósitos especiales, que están disponibles por separado) amplían el entorno de MATLAB permitiendo resolver problemas especiales en estas áreas de aplicación(Samira Hervella Azouzi., 2006).

Además, MATLAB contiene una serie de funciones para documentar y compartir su trabajo. Puede integrar su código de MATLAB con otros lenguajes y aplicaciones, y distribuir los algoritmos y aplicaciones que desarrollo usando MATLAB(Samira Hervella Azouzi., 2006).

### 2.2.3 Vectores y matrices

Uno de los aspectos más notables de Matlab lo constituye la forma en que permite manipular y operar con vectores y matrices (Elizondo, 2002).

#### *Vectores fila*

En general, se introducen escribiendo entre corchetes cada una de sus componentes separadas por un espacio o una coma. Por ejemplo (Elizondo, 2002):

```
>> v= [4 -6 5]
```

```
>> v= [4,-6,5]
```

También se pueden introducir especificando el valor de cada componente en el orden que se desee:

```
>> w(2)=-6, w(1)=4, w(3)=5
```

Otras órdenes para casos particulares:

**v=[a:h:b]** Define un vector “fila” cuyo primer elemento es a y los demás elementos aumentan de h en h sin superar b.

**v=[a:b]** Define un vector “fila” cuyo primer elemento es a y los demás elementos aumentan de 1 en 1 sin superar b.

**v=linspace(a,b,n)** Define un vector “fila” de n componentes, cuyo primer elemento es a y cuyo último elemento es b, con diferencia constante entre componentes consecutivas.

Ejemplos:

```
>> u=linspace(-4,7,6)
```

```
>> v=[-4:2:7], w=[-4:7]
```

```
>> v=-4:2:7, w=-4:7 % (se puede escribir sin los corchetes)
```

#### *Vectores columna y matrices*

En general, se introducen como los vectores “fila”, separando las filas por un punto y coma (Elizondo, 2002):

```
>> b=[0;1;-5]
```

```
>> a=[-2 4;5 -1;7 1]
```

También se pueden introducir especificando cada uno de sus elementos en el orden que se desee; por ejemplo (Elizondo, 2002):

```
>> m(2,2) = -1, m(3,1) = 7, m(2,1) = 5, m(1,1) = -2, m(1,2) = 4, m(3,2) = 1
```

Se pueden definir “por cajas” que estén construidas previamente y cuyas dimensiones sean adecuadas:

```
>> c= [a b]
```

#### *Elementos de vectores y matrices*

Hemos visto que es posible definir vectores y matrices especificando sus elementos. Una vez definida una matriz *a* o un vector *v*, también podemos acceder a sus elementos o submatrices con las órdenes siguientes (Elizondo, 2002):

*Tabla 4 Elementos vectores y matrices MATLAB.*

<b>v(i)</b>	componente de <i>v</i> que ocupa la posición <i>i</i> .
<b>v(i:j)</b>	componentes de <i>v</i> situadas entre la posición <i>i</i> y la posición <i>j</i> .
<b>a(i,j)</b>	elemento de la matriz <i>a</i> que está en la fila <i>i</i> y la columna <i>j</i> .
<b>a(i:j,k:l)</b>	submatriz de <i>a</i> que contiene las filas <i>i</i> hasta <i>j</i> y columnas <i>k</i> hasta <i>l</i> .
<b>a(i,:)</b>	fila <i>i</i> de la matriz <i>a</i> .
<b>a(:,j)</b>	columna <i>j</i> de la matriz <i>a</i> .
<b>a(u,w)</b>	submatriz de <i>a</i> que contiene las filas indicadas en el vector <i>u</i> y las columnas indicadas en el vector <i>w</i> .

*Fuente. (Elizondo, 2002).*

Ejemplos:

```
>> a(1,:)
>> a(:,2)
>> a([1,3],2)
```

#### *Algunas matrices especiales.*

En ciertas ocasiones se necesita definir matrices especiales, como identidades, matrices nulas, unitarias, diagonales, etc.(Elizondo, 2002).

**zeros(m,n)** Genera una matriz de ceros de dimensión  $m \times n$ .

**ones(m,n)** Genera una matriz de unos de dimensión  $m \times n$ .

**eye(m,n)** Genera una matriz de dimensión  $m \times n$ , cuya diagonal principal son unos y el resto de los elementos ceros.

Cuando las matrices son cuadradas de orden *n*, se puede sustituir el argumento (*m,n*) por (*n*).

Ejemplos:

```
>> zeros(2,3)
>> zeros(2)
```

```
>> eye(2,3)
>> eye(3)
```

#### 2.2.4 Tipos de imágenes digitales

En Matlab una imagen de grises es representada por medio de una matriz bidimensional  $m \times n$ , donde  $n$  representa el número de píxeles de largo y  $m$  de ancho, a diferencia de esto una imagen tipo RGB se maneja en una matriz tridimensional tipo  $m \times n \times p$ , donde  $m$  y  $n$  representan ancho y largo y  $p$  representa el plano, ya que en una imagen tipo RGB el plano 1 es *rojo*, plano 2 es *verde* y 3 *azul* (García, 2013).

##### *Extensiones que logra procesar Matlab*

Las extensiones que lograr soportar y procesar Matlab en análisis de imágenes son:

*Tabla 5 Extensiones de formato de imágenes usadas en Matlab.*

Formato	Extensión
TIFF	.tiff
JPEG	.jpg
GIF	.gif
BMP	.bmp
PNG	.png
XWD	.xwd

*Fuente. (García, 2013).*

JPG: El archivo de imagen más popular debido al poco tamaño que ocupa, al utilizar una excelente compresión con una pérdida de calidad mínima (Fotograff, 2012).

BMP: Archivo de mapa de bits y creado por Microsoft para MS DOS y Windows. Fue utilizado para sus fondos de escritorio y otras imágenes del sistema operativo, sobre todo en sus inicios con; Windows 3.0, 95. Es un archivo que pesa mucho y hoy en día no es muy recomendable usarlo al existir otros mejores (Fotograff, 2012).

TIFF: Es un archivo estándar para guardar imágenes de alta calidad y es compatible con Windows, Linux, Mac. Su desventaja es que ocupa mucho espacio de almacenamiento. Su extensión viene de Tagged Image File Format y lo creó Aldus, una compañía que pertenece a Adobe (Fotograff, 2012).

GIF: Originariamente se creó para guardar imágenes no fotográficas, como logotipos, imágenes vectoriales... y ahorrar así tamaño de archivo. Ocupa muy poco, acepta transparencias y puede ser animado (Gif animado), lo que lo hizo ideal como archivo de imagen para Internet, no obstante, si hacemos un GIF con una fotografía será de muy poca calidad debido a sus limitaciones (Fotograff, 2012).

PNG: Ideado para sustituir al GIF aportando mayor calidad de imagen y manteniendo las transparencias, pero no lo ha conseguido debido a que pesa más que el GIF y tampoco acepta animaciones. No obstante sigue presente y está a la par con el GIF (Fotograff, 2012).

XWD: captura el contenido de una pantalla o de una ventana y, opcionalmente, lo guarda en un archivo (Fotograff, 2012).

BMP: Es un archivo de mapa de bits, es decir, un archivo de imagen de gráficos, con píxeles almacenados en forma de tabla de puntos que administra los colores como colores reales o usando una paleta indexada. El formato BMP ha sido estudiado de manera tal que permite obtener un mapa de bits independiente del dispositivo de visualización periférico (Fotograff, 2012).

### *Clases de Imágenes*

Las clases de imágenes se tienen en cuenta según el tipo de dato y sus elementos como se muestra en la siguiente tabla (García, 2013).

*Tabla 6 Clases de imágenes.*

<b>Clase</b>	<b>Descripción</b>
Double	Doble precisión, números en punto flotante que varían en un rango aproximado de $-10^{308}$ a $10^{308}$ (8 bytes por elemento).
Unit8	Enteros de 8 bits en el rango de [0, 255] (1 byte por elemento).
Unit16	Enteros de 16 bits en el rango de [0, 65535] (2 bytes por elemento).
Unit32	Enteros de 32 bits en el rango de [0, 4294967295] (4 bytes por elemento).
Int8	Enteros de 8 bits en el rango de [-128, 127] (1 byte por elemento).
Int16	Enteros de 16 bits en el rango de [-32768, 32767] (2 bytes por elemento).
Int32	Enteros de 32 bits en el rango de [-2147483648, 2147483647] (4 bytes por elemento).
Single	Numero en punto flotante de precisión simple, con valores aproximadamente en el rango de $-10^{38}$ a $10^{38}$ (4 bytes por elemento).
Char	Caracteres (2 bytes por elemento).
Logical	Los valores son 0 o 1 (1 byte por elemento).

*Fuente. (P. P. G. García, 2013).*

### *Tipos de imágenes*

Imagen RGB: Una imagen RGB representa el color de cada pixel en un conjunto de tres valores que contiene una cierta cantidad de rojo, verde y azul para representar el color (Gòmez, 2009).

Imagen de intensidad: Este tipo de imágenes representan una escala de grises (Gòmez, 2009).

Imágenes binarias: los valores de intensidad en tonalidad de este tipo de imágenes se manejan únicamente en valores de 0 o 1 (Gòmez, 2009).

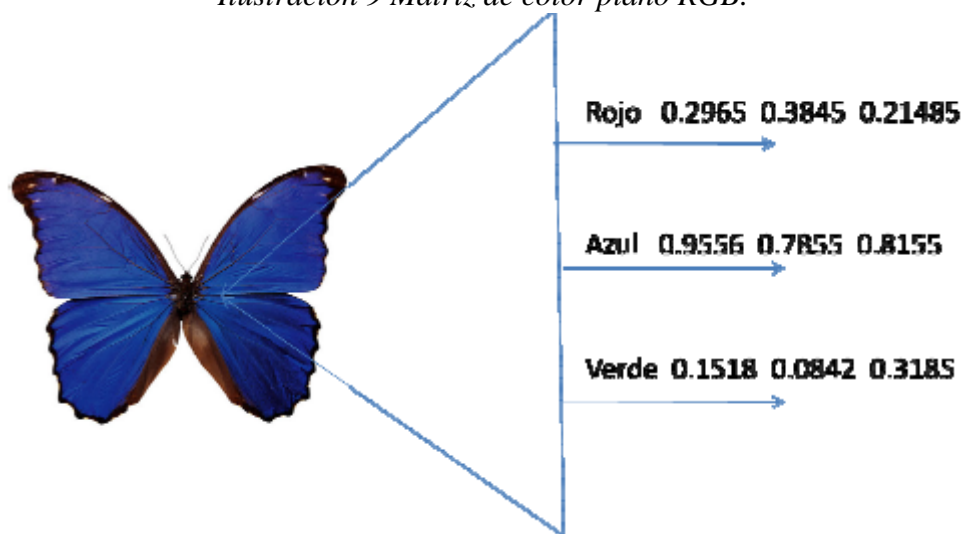
Imágenes indexadas: En este tipo de imágenes se usa un conjunto de colores limitados, su escala se encuentra entre 256 o menor, estos colores forman un denominado mapa de colores y a cada punto de ese mapa se le asigna un color (Gòmez, 2009).

### *Imágenes RGB*

Las imágenes RGB debido a que se basa en estructuran para el ojo humano, en este tipo de imágenes se representa cada color como un conjunto de tres valores uno *rojo* otro *verde* y otro *azul*. Según el tipo de color y su intensidad cada uno de estos valores posee cierto valor dentro de la imagen. En Matlab las imágenes RGB se dan por una matriz de  $n \times m \times 3$ , donde  $n$  y  $m$  son los planos y 3 es el plano de la imagen en donde se contiene cada uno de los colores por pixel. Por ejemplo para una imagen RGB que se desea saber los valores de color del pixel (28,37) según los 3 planos la ubicación de este sería (28,37,1.3) (Gòmez, 2009).

Se supone que el valor del pixel (28, 37,1) es de 0.57, el de (28, 37,2) es de 0,23 y el de (28, 37,3) es de 0.63. El color del pixel sería 0.57, 0.23, 0.63 (Gòmez, 2009).

*Ilustración 9 Matriz de color plano RGB.*

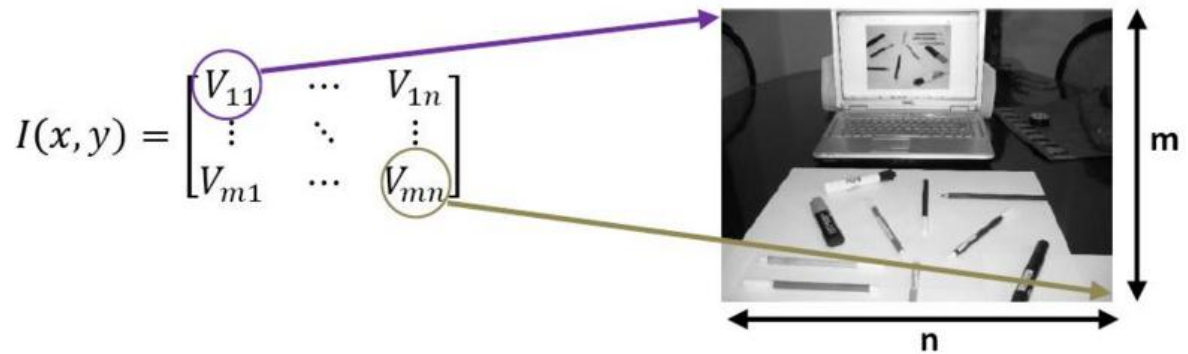


*Fuente. Tomado de (Gòmez, 2009).*

### *Imágenes de intensidad*

Las imágenes de intensidad en Matlab o imágenes a escala de grises en la cual cada elemento corresponde a un pixel dentro de la imagen, dependiendo si la imagen es de tipo *double* en la cual manejaría valor entre 0 y 1, o de clase *uint8* en cuyo caso manejaría valor entre 0 y 255 (Gòmez, 2009).

*Ilustración 10 Representación de una imagen a escala de grises en Matlab.*

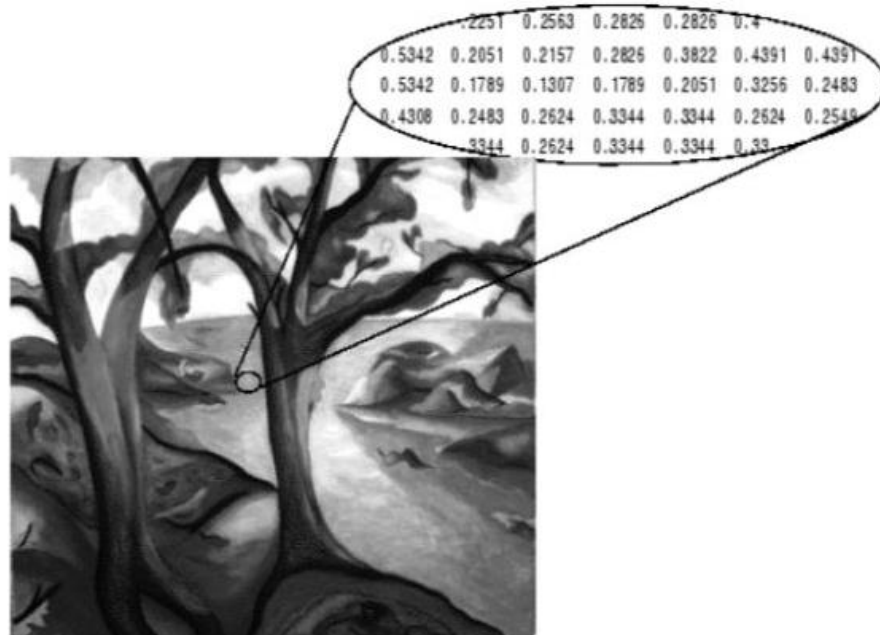


(García, 2013).

### *Imágenes Binarias*

Son imágenes las cuales cuentan con valores de color comprendidos entre 0 y 1, lo cual limita a los pixeles a manejarse entre estos 2 valores. Una imagen binaria puede ser almacenada en una clase *double* o *uint8*, en este tipo de imágenes es mucho más fácil encontrar y distinguir características estructurales (Gómez, 2009).

*Ilustración 11 Representación valores de pixel imágenes binarias.*



(García, 2013).

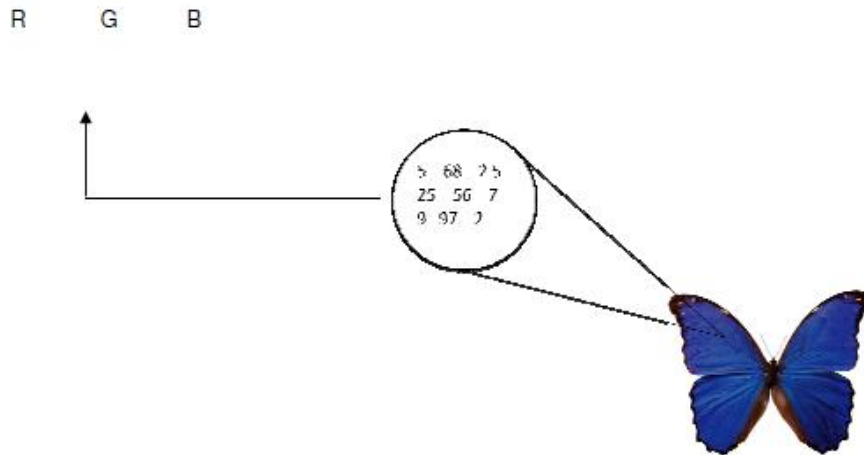
### *Imágenes indexadas*

Se almacena en Matlab como una imagen de dos matrices, la primera matriz posee las mismas características en cuanto a tamaño e información de pixeles y la segunda matriz se denomina mapa de color y su tamaño puede diferir del tamaño de la imagen. Los datos que



se encuentran en la primera matriz son una introducción o guía del color que se encuentra en el mapa de colores o colormap, de modo que los valores que se encuentran se dan en una escala de 255 o menos. El colormap es una matriz de tipo *m\*3* de clase *double* y cada fila de la matriz colormap especifica los valores de rojo, verde y azul (Gòmez, 2009).

*Ilustración 12 Representación de imagen indexa.*



(Gòmez, 2009).

Los valores R, G y B son valores dentro de un margen de 0 siendo el más opaco y 1 el de mayor intensidad, en la figura 3 se ilustra una imagen indexa donde los intensidades varían debido a las características de la imagen si estas tuvieran la misma intensidad los valores de los enteros que se presentan sería iguales en la información que se muestra del colormap. Los valores de la matriz y su colormap se verán afectados dependiendo si la imagen es *unit8* o *double*, debido a que si es de tipo *double* el valor de 1 apunta a la primera fila del colormap y la segunda al 2 valor y así progresivamente, a diferencia que si es *unit8* en el cual el valor de la primera fila tendera a 0, la segunda fila a 1 y así sucesivamente (Gòmez, 2009).

#### *Reconocimiento de patrones en imágenes.*

Este es uno de los métodos más utilizados y de mayor interés para la comunidad científica debido a que emula la visión del ser humano siendo capaz de hacer un reconocimiento de cara, objetos y formas entre otros. El reconocimiento de imágenes se basa en 4 etapas para lograr identificar los componentes en la imagen, las etapas necesarias para lograr esto son (González, 2009):

- Captura de imágenes
- Pre-procesamiento de la imagen
- Filtrado o segmentación
- Binarización
- Extracción de características
- Clasificación

- Decisión

Este reconocimiento de patrones de imágenes se utiliza en diversos campos de estudio como la biología, automatización industrial, teledetección y diagnóstico a partir de imágenes médicas (Samira Hervella Azouzi., 2006).

En los campos de la biología y biomedicina, el procesamiento de imágenes se usa para analizar visualmente las muestras biológicas. Hay varios casos donde el análisis ha sido completamente automatizado permitiendo tener unos resultados más confiables y rápidos. De cara a la realización de un óptimo análisis, se emplean herramientas algorítmicas como "contraste de balance" o "edge-sharpening" (Samira Hervella Azouzi., 2006).

En la industria, la automatización del procesamiento de imágenes se ha empleado para la inspección y supervisión automática en las líneas de producción de grandes empresas. Este sistema reduce significativamente el promedio de errores generados en los productos proporcionando estabilidad y precisión (Samira Hervella Azouzi., 2006).

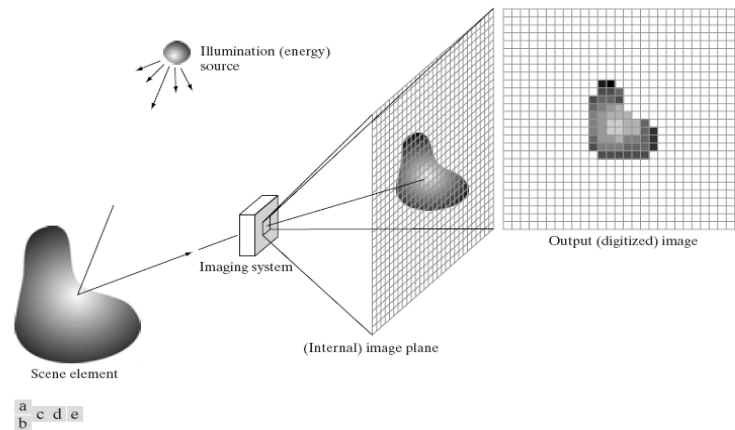
En el diagnóstico médico a partir de imágenes empleadas en técnicas de rayos X y las proyecciones CT médicas, estas se digitalizan para examinar áreas internas del cuerpo y así brindar un diagnóstico más exacto y confiable. Un número determinado de proyecciones CT se combinan y digitalizan automáticamente para producir imágenes 3-dimensionales (Samira Hervella Azouzi., 2006).

En teledetección, el reconocimiento de patrones se usa para la obtención de imágenes satelitales las cuales contienen fotografías de la corteza exterior de la tierra. Estos resultados se utilizan para analizar condiciones de crecimiento del cultivo, distribución de la vegetación, así como cambios geológicos, desastres naturales, daños en la capa de ozono, progresos de deforestación entre otros. El uso de estas imágenes tomadas de la corteza de la Tierra puede ser convertida en un modelo 3-dimensional usando imágenes 2d tomadas por dichos satélites (Samira Hervella Azouzi., 2006).

#### *Captura de imágenes*

En este proceso se logra digitalizar una imagen por medio de un sensor de luz y filtro de identificación de colores, almacenándola por RGB y guardando información para un posterior análisis. (González, 2009).

*Ilustración 13 Digitalización y almacenamiento de imagen.*



*Fuente. Tomado de (González, 2009).*

Para poder lograr esto es necesario tener un sensor denominado dispositivo de cargas electrónicas o CCD (*charge coupled device*) según sus siglas en inglés, este sensor se encarga de unir la información mediante células fotoeléctricas las cuales registran la imagen.(González, 2009).

#### *Pre-procesamiento de la imagen*

Seguido de la captura de imágenes se maneja la etapa de pre-procesamiento la cual se basa en la selección de información que será útil y la que no, esta última denominada información será identificada gracias a problemas de enfoque, ruido o pérdida de calidad en la foto. Este pre-procesamiento es un proceso de bajo nivel el cual busca eliminar el ruido que se encuentra en la imagen, dar una mejora de contrastes y características entre otras cosas (González, 2009).

*Ilustración 14 Mejora de contraste en pre-procesamiento.*



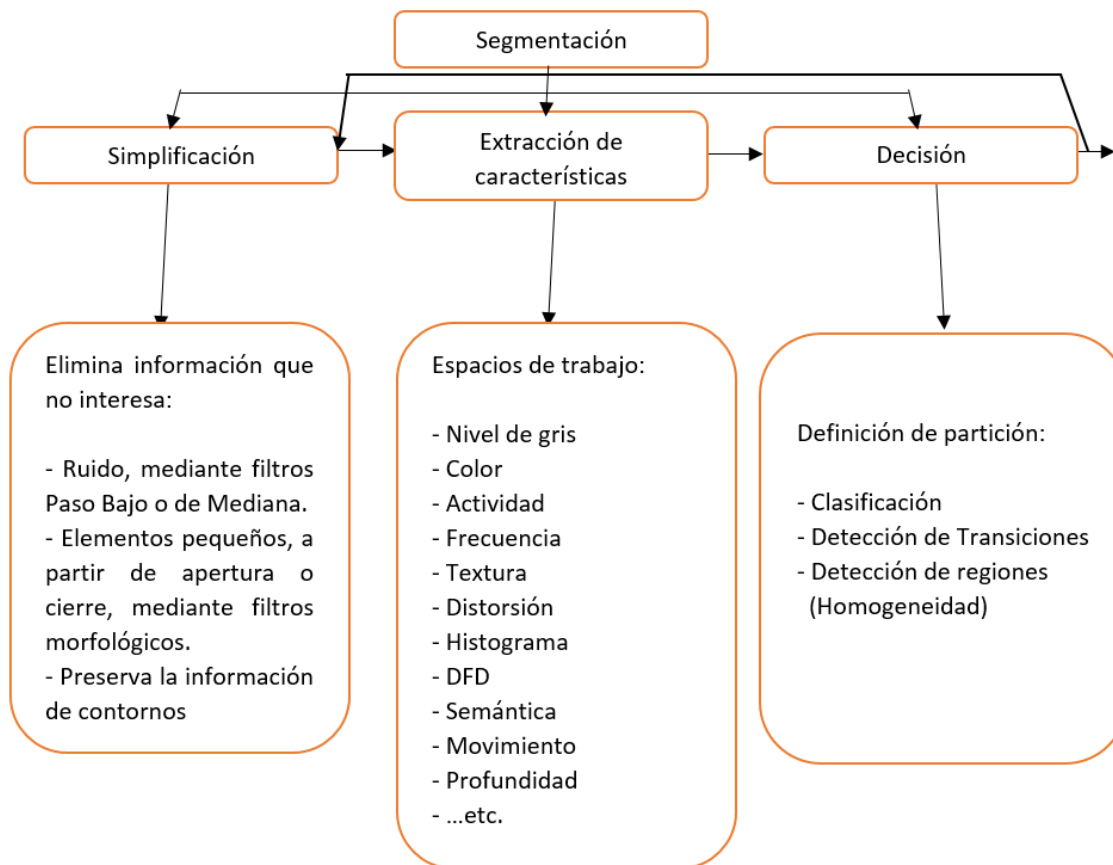
*Fuente. Tomado de (Jaramillo, 2009)*

#### *Filtrado o Segmentación*

Este proceso se basa en la partición de la imagen definiendo sus características. Según el contexto de la imagen sea temporal (1D), espacial (2D) o espacio-temporal (3D). De esta manera es posible identificar sus partes individualmente y seleccionar las deseadas. Este método debe implementarse de manera cuidadosa para lograr obtener los resultados deseados, si se genera un algoritmo de segmentación débil y errático se presentarían varias fallas en el momento de general la evaluación de la muestra (González, 2009).

Dentro del proceso de segmentación ocurren las siguientes etapas.

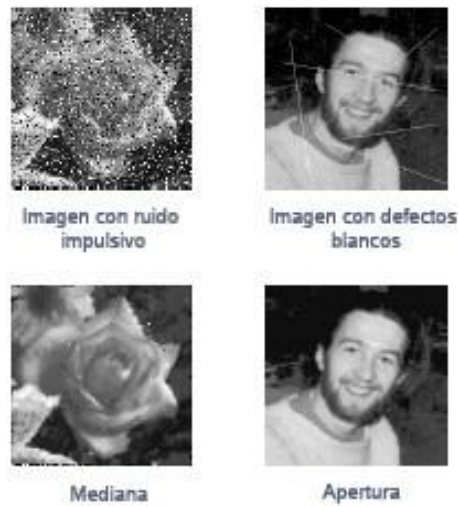
*Ilustración 15 Etapas de procesamiento en segmentación.*



*(Samira Hervella Azouzi., 2006).*

La simplificación: Es la etapa en la cual se descarta la información irrelevante, controlando de esta manera la cantidad de características que se desean obtener y la naturaleza de estas. En esta etapa se reduce la complejidad de textura, se elimina ruido u objetos muy pequeños según el tamaño especificado o deseado (Samira Hervella Azouzi., 2006).

### *Ilustración 16 Simplificación eliminación del ruido*

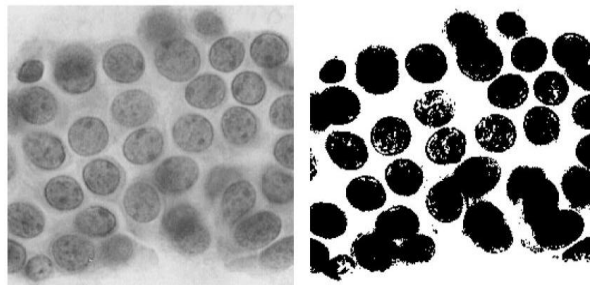


*(Samira Hervella Azouzi., 2006).*

Posteriormente comienza el proceso de extracción de características, la cual se basa en datos especificados por características. Su objetivo es dar homogeneidad a la imagen obtenidos mediante la aplicación de variables por el usuario en busca de pixeles con la información de interés en términos de frecuencia, textura, distorsión, histograma, DFD, profundidad. (Samira Hervella Azouzi., 2006).

Por último se ejecuta la segmentación, en esta parte se seleccionan los datos a utilizar teniendo en cuenta la posibilidad de darle contorno a los objetos eliminando las ultimas partes que puedan afectar la medición logrando un resultado como lo muestra mal imagen a continuación (Samira Hervella Azouzi., 2006).

### *Ilustración 17 Separación de objetivos de interés con respeto al fondo.*

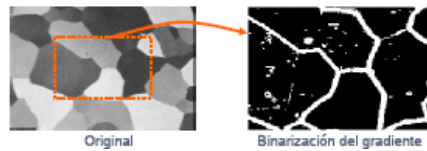


*Fuente. Tomado de (González, 2009).*

#### *Binarización*

En esta etapa el objetivo es pasar la imagen de colores a una escala de grises o a una escala de unos (1) y ceros (0), para lograr esto es necesario obtener el histograma de la imagen, (rangos de color que maneja cada pixel, medido por medio de los niveles de grises), teniendo esta información se busca aproximar los valores que se encuentren en el centro de la escala convirtiéndolos en 0 o 255 (Samira Hervella Azouzi., 2006).

*Ilustración 18 Proceso de binarizado de la imagen.*



*Fuente. Tomado de (Samira Hervella Azouzi., 2006).*

### *Extracción de características*

En esta etapa se pueden utilizar varios métodos para la extracción como el algoritmo de Watershed, cierre de contornos, algoritmo de Split & Merge, algoritmo de crecimiento de regiones, filtros Canny, segmentación basada en homogeneidad, algoritmo de Thinning, entre otros. En este caso hablaremos sobre Segmentación basada en homogeneidad, algoritmo de Thinning, cierre de contornos y algoritmo de Split & Merge (Samira Hervella Azouzi., 2006).

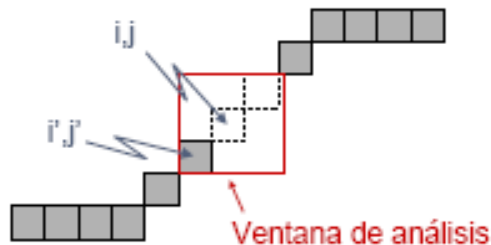
### *Cierre de contornos*

En el momento de desarrollar esta técnica se tienen en cuenta dos procesos:

El primero son las técnicas binarias: esta se basa en una imagen ya binarizada en la cual se le van a asignar valor de 0 o 255 aplicando cierre de contornos en la imagen (Samira Hervella Azouzi., 2006).

Seguida de esta técnica se desarrolla una técnica por medio de gradientes: esta es una técnica simple que se basa en el análisis del alrededor de cada uno de los pixeles que componen la imagen, uniendo los pixeles similares de esta unificando que comparten un criterio semejante (Samira Hervella Azouzi., 2006).

*Ilustración 19 Cierre de contornos mediante identificación de pixeles.*



*Fuente. Tomado de (Samira Hervella Azouzi., 2006).*

La *Ilustración 19* muestra cómo se da el análisis de píxeles diferentes con el fin de alterar el color de estos píxeles en cuanto a su color con el fin de lograr cerrar formas que se presentan en la imagen.

Existen 2 principales propiedades usadas para establecer este tipo de similitud:

La magnitud de respuesta del operador utilizando para producir el pixel del contorno y el gradiente de dirección del vector (Samira Hervella Azouzi., 2006).

Teniendo en cuenta estos dos principios el estudio se inicia en un pixel centrado el cual se compara con sus píxeles aledaños para verificar si poseen una magnitud y dirección similares. (Samira Hervella Azouzi., 2006).

### 2.2.5 Algoritmo de Thinning

El algoritmo de Thinning consiste en realizar diversos barridos con un conjunto base de píxeles buscando una similitud con sus píxeles adyacentes, comparándolos en diferentes ángulos de la imagen en intervalos de 90° hasta completar la circunferencia. Este método depende del conjunto de forma del elemento estructurante, Su principio matemático es (Samira Hervella Azouzi., 2006):

$$A \otimes \{B\} = \left( \left( \dots \left( (A \otimes B^1) \otimes B^2 \right) \dots \right) \otimes B^n \right) [6]$$

$$\{B\} = (B^1, B^2, B^3, \dots, B^n)$$

*Ecuación de Thinning.*  
(Samira Hervella Azouzi., 2006).

Donde  $\otimes$  representa la aplicación del algoritmo de Thinning sobre una imagen a partir de un conjunto de elementos B estructurados (Samira Hervella Azouzi., 2006).

### Segmentación Basada en Homogeneidad

La segmentación de homogeneidad funciona por dos etapas: La primera tiene dos métodos uno de estos se denomina criterio determinista en este se utiliza la siguiente fórmula (Samira Hervella Azouzi., 2006).

$$C_T = \sum_n \sum_{i,j \in R_n} [x(i,j) - M_n(i,j)]^2 [7]$$

*Ecuación de criterio determinista*

Donde el modelo MR (i, j) de la región R<sub>n</sub> se ajusta a los datos x (i, j) y la distancia es calculada entre el modelo de los datos y los mismos datos. Típicamente, se utilizan los modelos polinómicos de la orden bajo y la norma es la distancia de Euclidiana (Samira Hervella Azouzi., 2006).

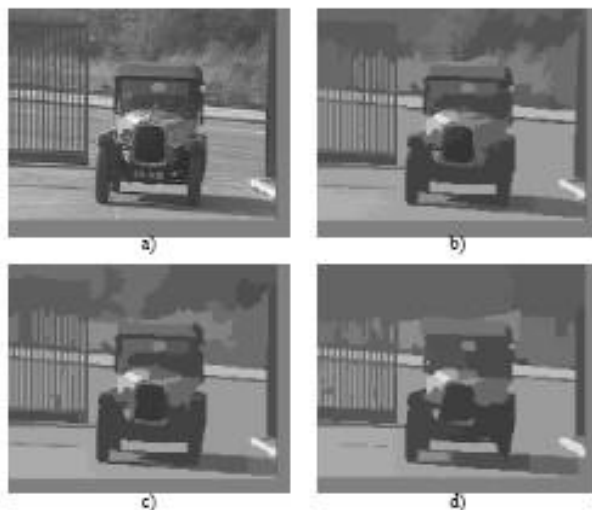
Para los Criterios Aleatorios, se asume que la región es una realización de un campo aleatorio  $V_c$ , y usualmente se calcula una probabilidad 'a posteriori' de que los datos sean una muestra de este campo aleatorio. Teniendo en cuenta la independencia entre las regiones y entre los píxeles vecinos, la expresión de la probabilidad es la siguiente (Samira Hervella Azouzi., 2006):

$$C = C_T * \Pi e^{(V_c)} [8]$$

*Ecuación de Transiciones*

Los modelos Gaussianos se utilizan con mucha frecuencia para caracterizar estos campos aleatorios. De acuerdo con la probabilidad estimada, se dice que la región es o no homogénea, en un gran número de casos, las implementaciones prácticas de estos dos tipos de criterio conducen a algoritmos muy similares. (Samira Hervella Azouzi., 2006).

*Ilustración 20 a) Imagen original, b) peso bajo c) peso medio y d) peso alto. Ejemplo de Criterio de Homogeneidad combinando textura con característica de color.*



*Fuente. Tomado de (Samira Hervella Azouzi., 2006).*

### 2.2.6 Algoritmo Slip & Merge

El algoritmo de Split & Merge, como su nombre indica, engloba dos procesos característicos, uno de división y el otro de fusión. (Samira Hervella Azouzi., 2006).

#### *Split*

A partir de la imagen original, que es considerada como el primer gran bloque, se procede a aplicar el Split, que es la aplicación de un determinado criterio de homogeneidad, si un bloque no lo cumple, se divide geométricamente en cuatro partes, que a continuación serán analizados por el mismo criterio. Dicho proceso se repite hasta que todos los bloques cumplan el criterio de división. Para definir el criterio que se ha tomado en la implementación de la aplicación en Matlab se parte de la diferencia entre los niveles de gris máximos y mínimos de los píxeles del bloque analizado y un umbral introducido por el usuario. El criterio se cumple, y por lo tanto no se produce un nuevo Split, siempre y



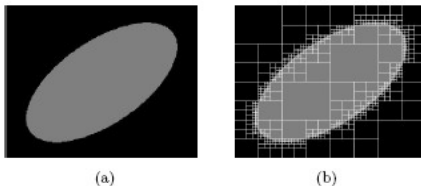
cuando la diferencia entre los valores de los píxeles citados sea inferior al umbral introducido (Samira Hervella Azouzi., 2006).

### *Merge.*

Una vez finalizada la fase de Split, se procede a realizar la de Merge, fase que une los bloques creados. En este caso, se ha de comprobar si dos bloques consecutivos, adyacentes, es decir, que estén en contacto, cumplen el criterio anterior. Si es así, dichos bloques quedarán fusionados, formando un único bloque. Dicho proceso se repite hasta llegar a la ipotencia, es decir el momento en el cual ya no pueden fusionarse más bloques, el criterio adoptado en este proceso es igual que el aplicado en el anterior, con el apunte adicional que el umbral de decisión puede ser variado entre la etapa de Split y la de Merge. Por lo general se suele tomar un umbral bastante estricto al realizar el Split, suavizándolo a continuación en el Merge. (Samira Hervella Azouzi., 2006).

Las principales ventajas de este algoritmo son, en primer lugar, su sencillez y simplicidad, tanto el algoritmo en sí, como la partición inicial desde la que se inicia el mismo (imagen original como primer gran bloque a tratar). Por otro lado, se tiene una visión global, y no local, de cómo va evolucionando el algoritmo.(Samira Hervella Azouzi., 2006).

*Ilustración 21 . (a)Imagen sintética, (b) Imagen dividida y fusionada. Función Algoritmo Slip & Merge.*



*Fuente. Tomado de (Samira Hervella Azouzi., 2006).*

### *2.2.7 Filtros Canny*

*Que es un filtro canny o algoritmo canny*

Este tipo de algoritmo fue desarrollado por John F. Canny en 1986 el cual deseaba detectar mediante un algoritmo de múltiples etapas los bordes de imágenes. Durante el desarrollo del algoritmo Canny nombro una serie de pautas para que ese cumpliera con todas sus exigencias las cuales eran (Rebaza, 2012; Canny, 1986).

- Buena detección- El algoritmo debe marcar el mayor número real en los bordes de la imagen como sea posible.
- Buena localización- Los bordes de marca deben estar lo más cerca posible del borde de la imagen real.
- Respuesta mínima - El borde de una imagen sólo debe ser marcado una vez, y siempre que sea posible, el ruido de la imagen no debe crear falsos bordes.

Mediante estos requisitos Canny utiliza el cálculo de variaciones - una técnica que encuentra la función que optimiza un funcional indicado. La función óptima en el algoritmo de Canny es descrito por la suma de cuatro términos exponenciales, pero se puede aproximar por la primera derivada de una gaussiana (Brown University, 2012; Canny, 1986).

El algoritmo de detección de bordes de Canny utiliza un filtro basado en la primera derivada de una gaussiana. Ya que es susceptible al ruido presente en datos de imagen sin procesar la imagen original es transformada con un filtro gaussiano. El resultado es una imagen un poco borrosa respecto a la versión original. Esta nueva imagen no se ve afectada por un píxel único de ruido en un grado significativo (Brown University, 2012; Canny, 1986).

Las etapas del algoritmo se dividen de 3 a 4 pautas.

- Obtención del gradiente.
- Supresión no máxima al resultado del gradiente.
- Histéresis de umbral a la supresión no máxima.
- Cierre de contornos abiertos.

*Como funciona un filtro canny*

*Obtención del gradiente*

Para obtener el gradiente se tiene que suavizar la imagen es necesario

- Aplicar a la imagen I un suavizado gaussiano G o filtro gaussiano (también se puede aplicar otros filtros)  $J = I * G$
- Para calcular el kernel gaussiano G utilizar la siguiente ecuación

$$G(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} [9]$$

*Kernel Gaussiano*

*(Samira Hervella Azouzi., 2006).*

- Seguido a esto se calcula el gradiente:
  - Para cada pixel de la imagen  $J(i,j)$
  - Calcular las componentes del gradiente  $J_x$  y  $J_y$
  - Calcular la magnitud de los bordes

$$e^s(i, j) = \sqrt{J_x^2(i, j) + J_y^2(i, j)} [10]$$

*Fórmula para la magnitud de bordes*

*(Samira Hervella Azouzi., 2006).*

- Estimar la orientación de la normal de los bordes

$$e_0(i,j) = \arctan \frac{J_y}{J_z} [11]$$

*Orientación bordes*

#### *Supresión no máxima al resultado del gradiente*

En esta parte se obtienen bordes de 1 pixel de grosor al considerar únicamente pixeles cuya magnitud es máxima en bordes gruesos y descartar aquellos cuyas magnitudes no alcancen ese máximo. (Rebaza, 2012; Canny, 1986).

- Para todo punto se obtiene la dirección más cercana de  
**dk a 0°, 45°, 90° y 135° en Ea(i,j)**
- Si Em(i,j) es menor que uno de sus dos vecinos en la dirección  
**dk, IN(i,j)=0. DE NO SER ASI**  
**dk, IN(i,j)=Em(i,j)**

#### *Histéresis de umbral a la supresión no máxima*

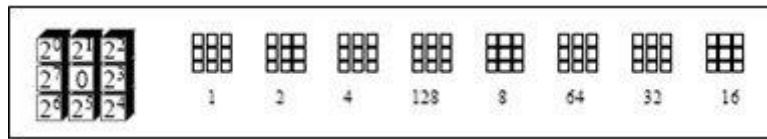
Algunas de las características de histéresis de umbral a la supresión no máxima son (Rebaza, 2012; Canny, 1986):

- Permite eliminar máximos procedentes de ruido.
- Entrada IN, Ea, y dos umbrales T1 y T2 donde T2>T1
- Para todo punto en IN y explorando en un orden:
  - Localizar el siguiente punto tal que IN(i,j) > T2
  - Seguir las cadenas de máximos locales a partir de IN(i,j) en ambas direcciones perpendiculares a la normal al borde siempre que IN>T1. Marcar los puntos explorados.
- La salida es un conjunto de bordes conectados de contornos de la imagen, así como la magnitud y orientación.

#### *Cierre de contornos abiertos*

- La imagen de entrada es una imagen de contornos binarizada (1= borde; 0=no borde).
- Para cada punto de borde de un extremo abierto se le asigna un código que determina las direcciones de búsqueda para el cierre del contorno.

*Ilustración 22 Asignación de código para cierre de contornos.*

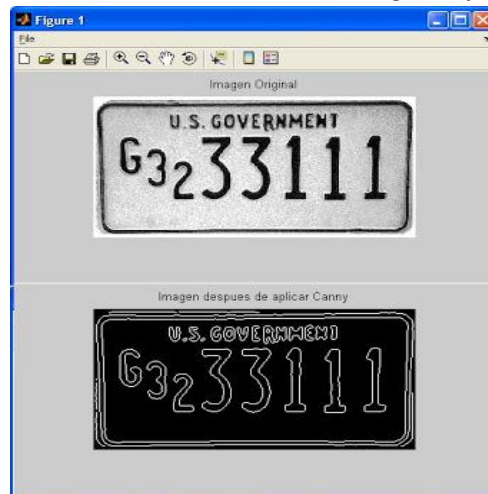


*Fuente. Tomado de (Canny, 1986).*

- Para los pixeles marcados con este código se marca como pixel de borde el de máximo gradiente en las tres direcciones posibles.
- Se repiten los pasos hasta que se cierren todos los contornos. Algoritmo de Deriche y Cocquerez. (Brown University, 2012; Canny, 1986).

Al desarrollarse todos los pasos los resultados obtenidos del algoritmo canny son:

*Ilustración 23 Tratamiento de imágenes filtros Canny.*



*Fuente. Tomado de (Canny, 1986).*

Con base a este tipo de tratamiento de imágenes, se muestra este tipo de algoritmo y procesamiento como una de las mejores opciones en el desarrollo del algoritmo para este proyecto de grado debido a que la definición de los contornos y la forma de autocorrección en el momento de completar contornos nos ayuda a evitar la pérdida de datos en el momento de procesar las imágenes que cuentan con una alta porosidad o unas características de tamaño de poro baja (Brown University, 2012; Canny, 1986).

### *Código y ejemplo*

A continuación se muestra la estructura de un código canny comparándolo con dos diferentes funciones en detección de bordes.

```
% detección de bordes en imagen con Matlab
% leer imagen
```

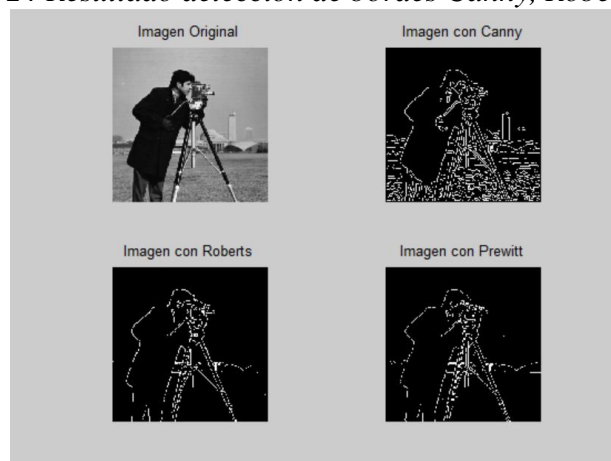
```

I=imread('cameraman.tif');
% aplicamos la deteccion de bordes
% Canny
DBCanny=edge(I,'Canny');
% Roberts
DBRoberts=edge(I,'Roberts');
% Prewitt
DBPrewitt=edge(I,'Prewitt');
% mostramos los resultados obtenidos
subplot(2,2,1)
imshow(I),title('Imagen Original');
subplot(2,2,2)
imshow(DBCanny),title('Imagen con Canny');
subplot(2,2,3)
imshow(DBRoberts),title('Imagen con Roberts');
subplot(2,2,4)
imshow(DBPrewitt),title('Imagen con Prewitt');

```

Resultado:

*Ilustración 24 Resultado detección de bordes Canny, Roberts y Prewitt.*



*Fuente. Tomado de (Brown University, 2012).*

Cómo se logra observar el detector de bordes con mayor sensibilidad y mejor detección de bordes dentro de la imagen es el filtro tipo canny.

### 3 *Objetivos*

#### 3.1 *Objetivo general*

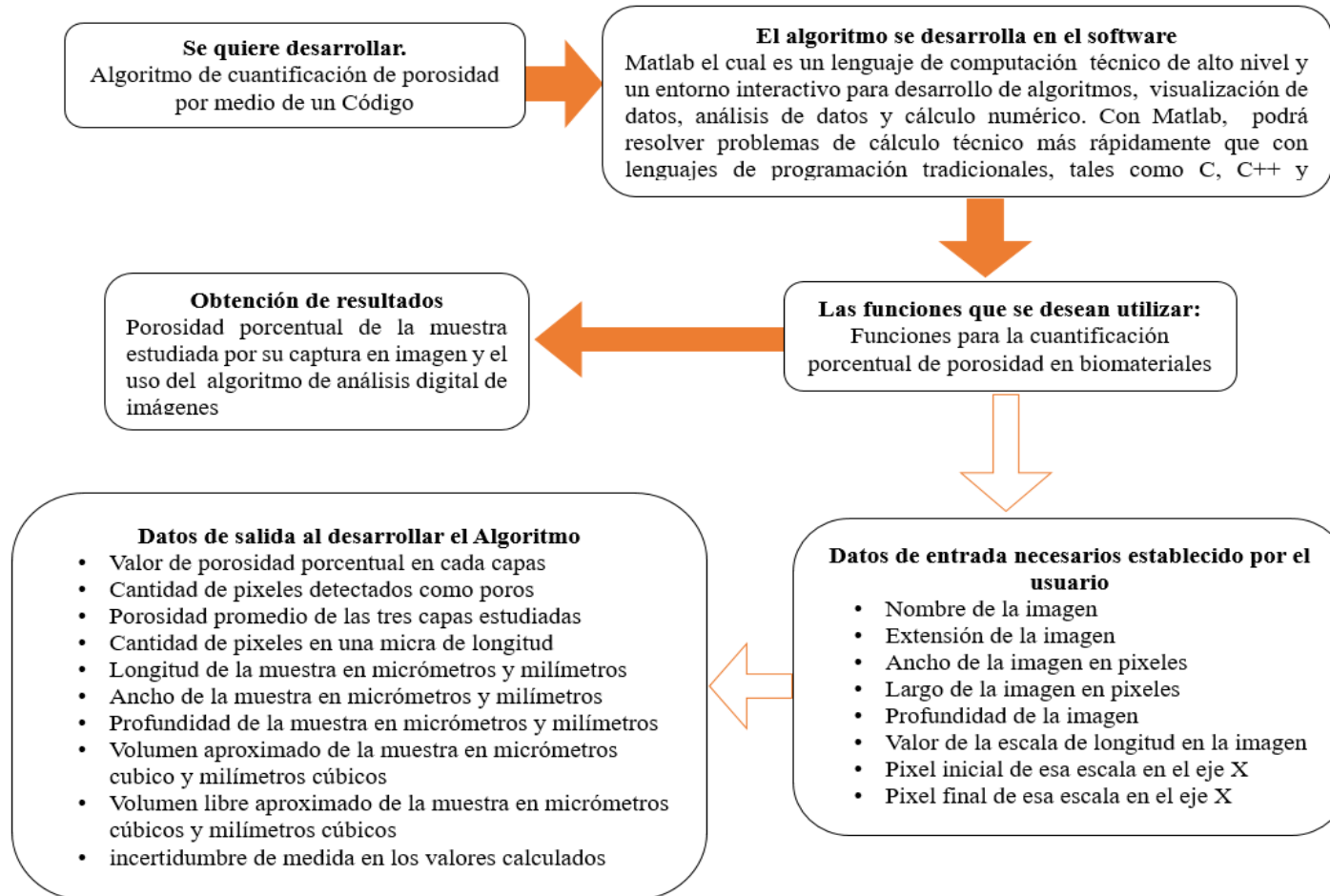
Desarrollar un algoritmo que cuantifique la porosidad de biomateriales en condiciones *in vitro* empleados en regeneración tisular por medio de análisis de imágenes.

#### 3.2 *Objetivos específicos*

- Diseñar un algoritmo que permita la cuantificación de la porosidad en condiciones *in vitro*.
- Implementar el algoritmo desarrollado en imágenes tomadas con un microscopio óptico y probar su funcionamiento en diferentes tiempos del análisis biológico sobre un biomaterial polimérico.
- Evaluar la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados de porosidad obtenidos del biomaterial polimérico en condiciones *in vitro*.

#### 4 Descripción del producto y matriz de requerimientos

*Ilustración 25 Diagrama de funcionamiento esperado del algoritmo primera parte.*



*Ilustración 26 Diagrama Rango de valores que maneja el algoritmo según su salida.*

- Porcentaje de porosidad por capa y total rango de < 0% - 100%>
- Unidad de largo < pixeles, micrómetros y milímetros>
- Unidad ancho < pixeles, micrómetros y milímetros>
- Unidad Profundo < micrómetros y milímetros>
- Volumen de la muestra y volumen libre < micrómetros cúbico s y milímetros cúbicos>
- Incertidumbre de la los valores obtenidos se expresan mediante una cifra significativa <1, 0.1, 0.01, 0.001>



Algoritmo	Tiempo de respuesta	10s -1min
	Ingreso de variables	Largo Ancho Profundo Medida longitudinal
	Tipo de procesamiento	Procesamiento por capas Cuantificación de porosidad por valor porcentual 0% a 100%.
Material o muestra	Grosor de la muestra	5 $\mu$ m a 100 $\mu$ m
	Tamaño de la muestra	0,5mm x0,5mm a 2mmx2mm
Microscopio	Acercamiento	10x a 1500x
	Incidencia del haz de luz	Directa o indirecta
	Toma de la muestra	Sin puntos oscuros Que la muestra ocupe todo el foco del lente evitando partes libres
Usuario	Conocimientos básicos	Matlab Microscopia Óptica
	Busca de datos en Matlab	Conocer la interface de imágenes de Matlab Como ubicar un pixel y extraer la información de este por medio de la función Data Cursor de Matlab

*Tabla 7 Requerimientos deseados para el algoritmo desarrollado.*

## 5 Metodología

### 5.1 *Consulta en bases de datos y características mínimas de los materiales para uso biológico.*

Se consultaron las bases de datos del DIN, ASTM, ISO, NTC y DAD con el fin de obtener la información necesaria para las características que debe tener el algoritmo para su medición y caracterización.

### 5.2 *Desarrollo Algoritmo: funciones básicas y desarrollo total.*

Teniendo en cuenta el tipo de microscopia que se empleó, se tuvieron en cuenta las funciones que se deseaban realizar en algoritmo; una vez establecidas las bases del programa se creó un diagrama de flujo el cual muestra las etapas y procesos que tiene que desarrollar el programa para determinar la medida de porosidad en la escala deseada.

El desarrollo del código y la técnica se dividirá en etapas.

#### 5.2.1 *Etapas 1. Obtención de imágenes*

Desarrollo del código para procesamiento de imágenes en cuantificación de porosidad, con el fin de dar a conocer la cantidad porcentual de poros presentes en la muestra y el volumen libre que hay dentro de la muestra.

Se implementa la captura de imágenes la cual se basa en la captura y digitalización de la muestra por medio del uso del microscopio óptico ZEISS image.A2 el cual nos permitió la tomar las imágenes en acercamientos de 20X para el PLGA y 40X para matriz extracelular de cerdo y almacenarlas en un CD mediante el programa ZEN versión 2013 de Windows, el cual cuenta con características de captura enfoque y contrastes dentro de la imagen obtenida del microscopio, ZEN es un programa creado con el fin de obtener imágenes de un microscopio óptico y que mediante este sea posible guardarlo en la extensión de imagen deseada, además puede recortar puntos de interés y creando la línea de escala de la imagen en el borde inferior derecho.

#### 5.2.2 *Etapas 2. Desarrollo del código*

Al obtener las Imágenes se inició el desarrollo de esta etapa en la cual se establecieron las funciones con mejores características de extracción y obtención de información para el desarrollo del algoritmo, por medio de la consulta de diferentes tipos de funciones de Matlab y se estableció que las mejores lógicas computacionales serian Algoritmo Slip & Merge, Segmentación basada en homogeneidad, Cierre de contornos, Filtrado y Segmentación, Pre-procesamiento, Binarizado, Gaussiano y Clasificación.

Estas funciones se implementaron de diversas maneras esperando obtener el mejor resultado sobre la muestra con la menor cantidad de pérdida de datos posibles para ello se implementó una imagen que contara con varios planos de porosidad y se buscó obtener la

información de cada uno de estos planos evitando la mayor cantidad de ruido sobre la imagen.

### 5.2.3 *Etapa 3 Análisis y procesamiento de las imágenes con el algoritmo*

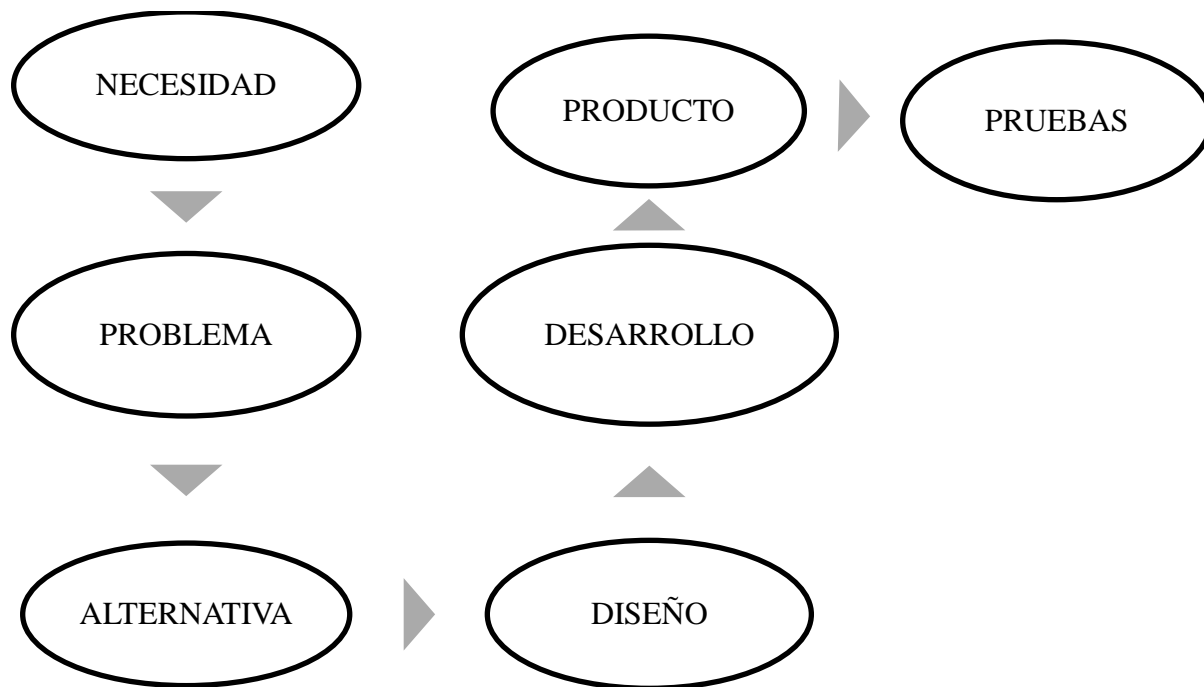
Al obtener el resultado deseado en el algoritmo este se implementó con las muestras de estudio, utilizando un biocompuesto de PLGA solo y después de un estudio *in vitro*; como también se utilizó como adicional para la profundización y prueba del método una película delgada de matriz extracelular de cerdo, estas muestras contaban con ciertas características, como la matriz de cerdo, esta se encontraba cortada de manera simétrica y plana en su superficies lo cual permitía que en el momento de realizar una toma de la imagen se obtuviera una clara vista sobre el medio y una buena vista de la superficie, a diferencia de algunas de las muestras de PLGA las cuales contaban con superficies en relieve lo cual dificultaba tomar de manera clara todos los planos, es este caso se buscó mediante el algoritmo hacer un estudio por tres diferentes capas, la capa superior evaluando porosidades que se encontraran en el parte externa del material, la capa media y la capa baja siendo esta la encargada de medir las características internas del material, es decir, en esta medida capa se buscaba medir el poro dentro del poro, como también lograr descartar las características biológicas que presenta la muestra midiendo únicamente los poros presentes en la matriz.

### 5.2.4 *Etapa 4 Obtención de resultados*

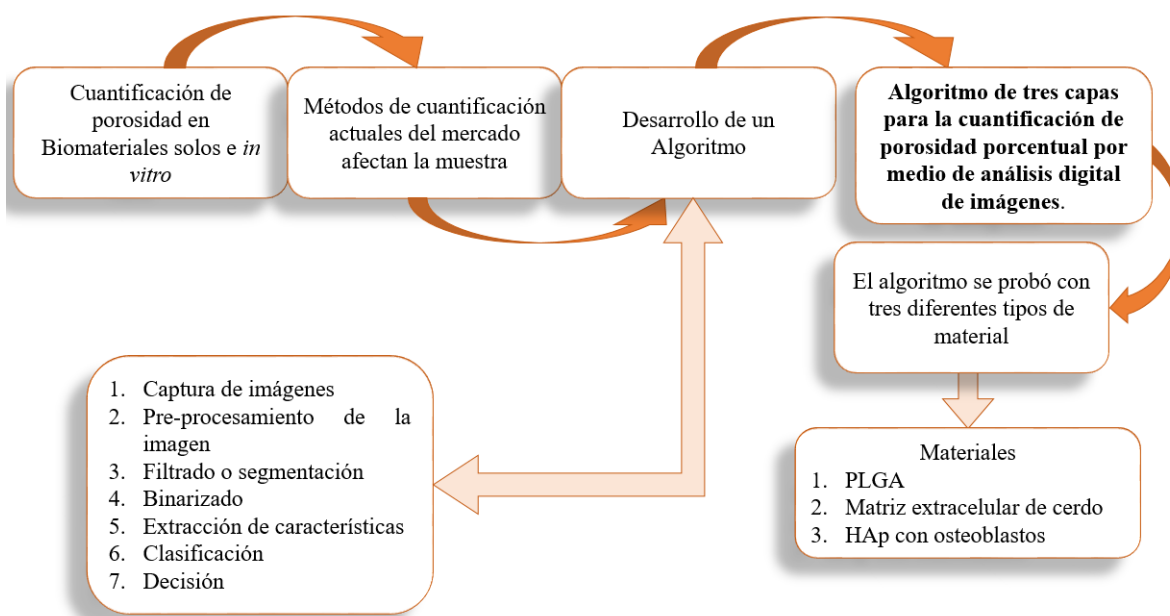
Logrado esto se procede a examinar la información por medio del porcentaje de porosidad presente en la muestra realizándose un cálculo de cantidad de poros detectados por capa y promediando los tres valores para dar un aproximado total de porosidad de la muestra estudiada, al obtener este porcentaje se utilizaba la ecuación de volumen en el cual se colocaban las dimensiones de la muestra y de esta manera el valor del volumen multiplicado por el porcentaje de porosidad medido nos muestra un valor de área libre dentro del material.

### 5.3 Diseño global y detallado

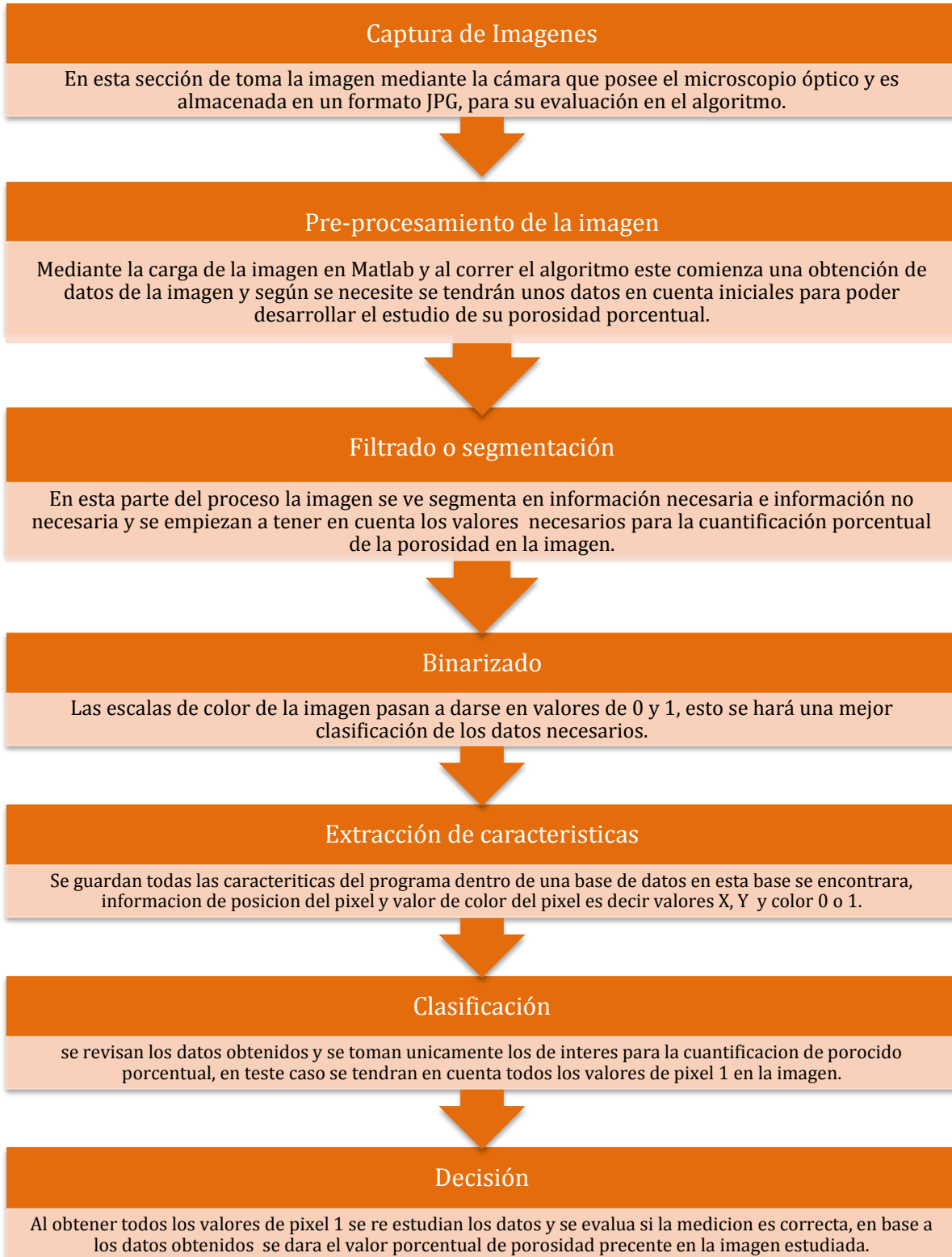
*Ilustración 27 Diseño global en el cual se basó el diseño desarrollo.*



*Ilustración 28 Diseño detallado en el cual se basó el desarrollo.*



*Ilustración 29 Funciones deseadas para el algoritmo.*



## 6 Implementación y pruebas

### 6.1 Determinación teórica de incertidumbres y cálculos de volumen

Los siguientes cálculos son aplicados a los resultados que se obtuvieron de las imágenes de los materiales estudiados en este proyecto, con el propósito de determinar la precisión en la cuantificación de volumen libre que se obtiene con el algoritmo diseñado.

En esta sección, se realizaron los cálculos para determinar las incertidumbres de medida de cada uno de los valores del algoritmo, así como los cálculos empleados para hallar los volúmenes de las muestras los materiales.

Se definen los valores de los pixeles inicial y final de la muestra 1 de PLGA a 20X según se ubicaron en Matlab sus datos obtenidos son.

$$\text{Pixel Inicial} \rightarrow P_i = 1165\text{pix}$$

$$\text{Pixel Final} \rightarrow P_f = 1358\text{pix}$$

Se halla el valor del pixel por micra:

$$p_i - p_f = 193\text{pix} \pm 0,5\text{pix} \rightarrow \frac{193\text{pix} \pm 0,5\text{pix}}{100 \mu\text{m}} = 1,93 \frac{\text{pix}}{\mu\text{m}} \pm 0,005 \frac{\text{pix}}{\mu\text{m}} \quad [12]$$
$$1\mu\text{m} = 1,93 \text{ pix}$$

*Valor del pixel en una micra.*  
(Andres Fernando Burgos, 2010).

Se dan los valores de largo ancho y profundidad de la muestra; siendo el largo el valor en X de la imagen, el ancho el valor en Y y Z es un aproximado a lo que se piensa que tiene de grosor la muestra.

$$\text{Largo de la imagen} \rightarrow X = 1388\text{pix} \pm 0,5\text{pix}$$

$$\text{Ancho de la imagen} \rightarrow Y = 1040\text{pix} \pm 0,5\text{pix}$$

$$\text{Grosor de la imagen} \rightarrow Z = 100\mu\text{m}$$

$$\text{Porcentaje de porosidad} \rightarrow P = 18,45\%$$

Se utilizara la ecuación de porcentaje error para determinar la trazabilidad de los cálculos y establecer su incertidumbre. El valor de incertidumbre dado en las medidas de la imagen se da en base a la escala más pequeña que muestra la imagen dividida en 2.

$$\text{porcentaje de error} \rightarrow Ir\% = \sqrt{\left(\frac{\text{Incertudumbre absoluta}}{\text{Valor medido}} * 100\right)^2} \quad [13]$$

*Porcentaje de error.*  
(Andres Fernando Burgos, 2010).

Se halla el ancho de la imagen en Micrómetros promedio de los valores obtenidos anteriormente en ancho pixeles y valor pixel por micra.

$$Y * \frac{1\mu m}{1,93pix} = 538,86\mu m \quad [14]$$

*Conversión del ancho de la muestra de pixeles a micras.*

Una vez conocido el ancho en micras se utiliza la ecuación de porcentaje error para hallar la incertidumbre de la medida en el valor del ancho.

$$Ir\% = \sqrt{\left(\frac{0,5pix}{1040pix} * 100\right)^2 + \left(\frac{0,005pix/\mu m}{1,93pix/\mu m} * 100\right)^2} = 0,3\% \rightarrow Y = 538,86\mu m * \frac{0,3}{100} = 1 \quad [15]$$

*Valor de la incertidumbre en el ancho de la imagen en micrómetros.*

En el valor de porcentaje error se tendrá en cuenta únicamente una cifra significativa siendo en este caso  $Ir\%$  para  $Y=1$  por ende el valor de  $Y$  y su incertidumbre en micras será.

$$Y = 538\mu m \pm 1\mu m \quad [16]$$

*Ancho de la muestra en micrómetros.*

Se repite el proceso con los valores de  $X$  y  $Z$

$$X = 719\mu m \pm 2\mu m \quad Z = 100\mu m \pm 0,5 \quad [17]$$

*Valores largo y ancho de la muestra en micrómetros.*

Pasamos estos datos de micras a milímetros la cual es la medida que deseamos reportar.

$$Ymm = (538\mu m \pm 1\mu m) * \frac{1mm}{1000\mu m} = \frac{538\mu m}{1000\mu m} \pm \frac{1\mu m}{1000\mu m} * 1mm = 0,538mm \pm 0,001mm \quad [18]$$

*Ancho de la muestra en milímetros.  
(Andres Fernando Burgos, 2010)*

Sabiendo esto se procede a hallar el volumen de la muestra, su volumen libre e incertidumbre.

$$V = X * Y * Z \quad [19]$$

*Volumen de la muestra.*  
(Andres Fernando Burgos, 2010)

$$Ir\% = \sqrt{\left(\frac{0,002mm}{X} * 100\right)^2 + \left(\frac{0,001mm}{Y} * 100\right)^2 + \left(\frac{0,001mm}{Z} * 100\right)^2} = VIr\%$$

$$Vt = V * \frac{VIr\%}{100} \quad [20]$$

*Ecuación 20 Ecuación porcentaje de error y e incertidumbre para el volumen.*

$$Vt = 0.0388mm^3 \pm 0.0006mm^3 \quad [21]$$

*Volumen total de la muestra.*

Después de esto se halla el volumen libre (Vl), por medio del valor de volumen total hallado se multiplique por el porcentaje de porosidad (P) y se divida en el valor de 100 para obtenerlo únicamente en la escala de mm<sup>3</sup> esto se realiza por medio de siguiente ecuación.

$$Vl = \frac{Vt}{100} * P \rightarrow Vl = 0.0072mm^3 \pm 0.0006mm^3 \quad [22]$$

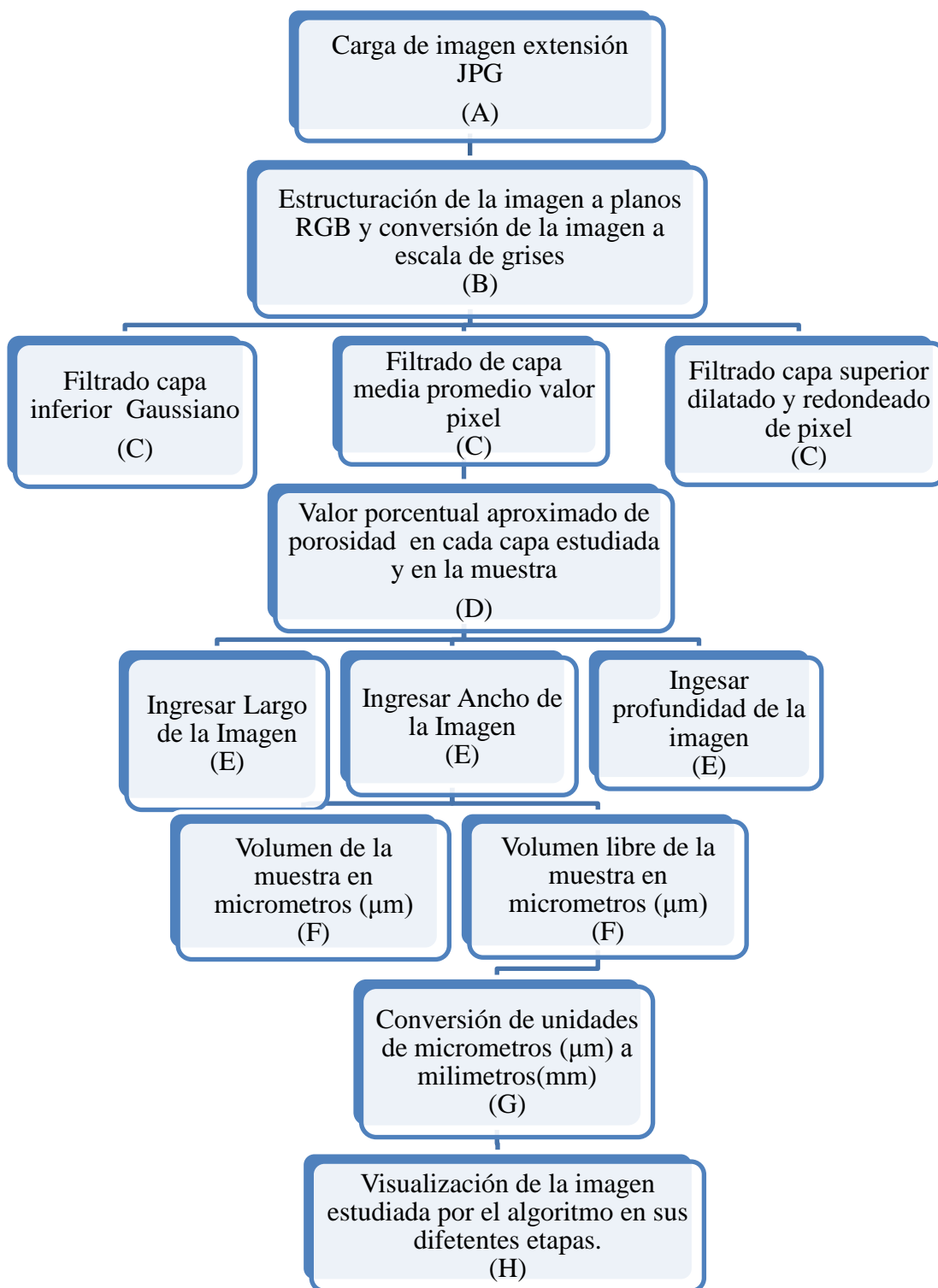
*Ecuación 22 Volumen total de la muestra.*  
(Andres Fernando Burgos, 2010).

El valor Obtenido en este cálculo nos da el volumen libre dentro de la muestra siendo (Vl) el volumen total libre de la muestra estudiada.



## 6.2 Algoritmo de tres capas para la cuantificación de porosidad porcentual.

Ilustración 30 Diagrama del algoritmo según el funcionamiento deseado y desarrollado



### 6.3 Profundización y explicación detallada del algoritmo desarrollado

En el momento de desarrollar las funciones y obtener los datos de las imágenes mediante el algoritmo se estableció la extensión para su uso y se definió el formato JPG debido a que este tipo de formato es ligero para su procesamiento y las imágenes que se encuentran dentro de esta extensión tiene una perdida mínima de calidad, además de esto es posible conseguir esta extensión en la toma de muestras del microscopio óptico evitando así cualquier procedimiento adicional de conversión y acoplamiento de la imagen. El algoritmo desarrollado cuenta con un procesamiento de conversión RGB mediante este la imagen se divide en tres colores base: rojos, azules y verdes. Este proceso se emplea en imágenes a color pero en este caso las imágenes son a escala de grises lo que se busca es utilizar cada plano para tener valores unitarios de pixel entre 0 y 255.

A continuación se describe el algoritmo completo con cada una de sus etapas y las funciones que cumplen estas en el momento de analizar y extraer información de una imagen de las muestras estudiadas.

#### 6.3.1 Sección (A) del diagrama

En esta sección inicial del programa es posible la carga de la imagen que se tomó en el microscopio óptico ZEISS y se guardó como formato JPG gracias al programa ZEN el cual crea una interfaz directa con el microscopio óptico ZEISS y permite la toma de la imagen.

##### Captura del nombre de la imagen

- `nombre=input('Ingrese el nombre de la imagen: ','s')` -Nombre del archivo que se desea examinar
- `extensión= input('Ingrese la extensión de la imagen: ','s')` -Que extensión tiene la imagen en nuestro caso sugerimos que se JPG
- `ArchivoCompleto = strcat(nombre,'.',extension)` -Lectura de las características digitadas anteriormente búsqueda en el equipo local

#### 6.3.2 Sección (B) del diagrama

Después de capturada y cargada la imagen con el código presentado en la sección (A), se procede a procesarse mediante su clasificación en sus tres diferentes planos debido a que las imágenes obtenidas son indexadas, estas constan de tres valores de colores y de unas características en pixel de posición. Se nombran las características de este tipo de imágenes las cuales son de tipo unit8, clasificadas dentro de un rango de valores de 0 a 255, como se evidencia en la *Tabla 6* del texto. Haciendo la clasificación de los pixeles en su rango de colores y pasando todos estos planos a una escala de grises se identifica de forma más sencilla los datos de interés de la imagen por medio del algoritmo.

### Carga de la imagen

```
• Imagen1=imread(ArchivoCompleto);  
• f= Imagen1;  
• Im_bin= im2bw(f);
```

-se establece la imagen en escala de grises con números de 0 a 255 siendo 0 negro y 255 blanco.

```
% digitalización en las tres capas de color  
• fR=f(:, :, 1); fG=f(:, :, 2); fB=f(:, :, 3);
```

-División planos RGB, siendo 1=plano de rojos, 2=plano de verdes y 3=plano de azules

Al realizar esto se procede a tomar la imagen y aplicar los filtros respectivos para cada plano, iniciando por filtro Gaussiano, luego filtro por promedio o ‘average’ y finalmente el plano superior en el cual se hace un hinchamiento de los poros.

#### 6.3.3 Sección (C) del diagrama

Para esta parte del procesamiento del algoritmo se tienen en cuenta tres diferentes características que se le implementaran a la imagen para lograr su procesamiento de una manera más rigurosa y no únicamente basados en el plano que nos muestra la imagen; inicialmente se procede a un tratamiento de los pixeles en la capa inferior de la imagen por un método Gaussiano el cual se basa que cada pixel en la imagen será dividido por el la raíz del valor de dos pixeles como lo muestra la siguiente ecuación.

$$P_G = \frac{1}{\sqrt{2}} \quad [23]$$

*Procesamiento de pixel mediante el método Gaussiano.*  
(Brown University, 2012).

Por medio de este tratamiento en los pixeles es posible separa los poros grandes o que se encuentran unidos de alguna manera y hacer una detección de cada uno de estos de una forma más eficiente este proceso en el algoritmo se guarda en la variable *h1* del algoritmo.

Seguido de este tratamiento se retoma la imagen original y se procede a utilizar la función “average” la cual crea un valor medio o promedio en este caso de color clasificando cantidad de pixeles entre los valores 0 a 255 y tomando los valores de un rango medio de la imagen siendo estos sus datos de interés para la cuantificación de porosidad en el plano medio este procesamiento se define mediante la variable *h2*.

Por último se procesa la capa superior de la imagen en esta parte se usa el método “imdilate e imerode” estas dos funciones de Matlab harán que los poros detectados en la capa superior se dilaten o agranden un tamaño definido en este caso 15 veces su tamaño normal y además de esto después de agrandarse estos tomen una forma redonda es decir no

cuenten con esquinas sino que sean circulares este procesamiento se define por medio de las variables SE, fdil, y fero.

#### Filtrado de la imagen gaussiano, dilatado y por promedio del pixel

```
fn=Imagen1;
h1= fspecial('gaussian');
h2= fspecial('average');
g1l= imfilter(fn,h1);
media2 = imfilter(fn,h2);
SE=strel('square',15);
fdil=imdilate(f,SE);
fero=imerode(f,SE);
```

Después de procesados los tres filtros de capa se procede a intensificar los colores que se obtuvieron en los filtros con el objetivo de que estos tiendan a el valor de 0 el cual es la parte oscura es decir los negros en este caso el material en la imagen y a 255 siendo ese el blanco de la imagen y la porosidad.

#### %Realzamos el contraste de la imagen

```
g=intrans(media2, 'stretch', mean2(im2double(f)),0.9);
```

Conseguida esta intensidad se binariza la imagen y sus valores cambian de ser de 0 a 255 y se dan entre 0 y 1 de esta manera se identifican los poros 1 y el sólido 0 y se inicia el proceso de conteo de porosidad por cada uno de los filtros realizados, obteniendo la cantidad de porosidad hallada mediante un valor porcentual.

#### %filtrado para capa del fondo

```
h=rgb2hsi(g);
H=h(:, :, 1); S=h(:, :, 2); I=h(:, :, 3);
g1=h;
Im_bin1=im2bw(g);
[filal,columnal]= size(Im_bin1);
```

#### %conteo de porosidad para la capa fondo

```
porosidad1 = 0;
fori=1:filal
    for j=1:columnal
        valor= Im_bin1(i,j);
        if valor==1
            porosidad1 = porosidad1 + 1;
        else
            end
        end
    end
end
```

#### % porcentaje de porosidad capa

```
pixeles1= filal * columnal
```

```

porosidad1
porcentaje1 = (porosidad1/pixeles1)*100

```

% variación del contraste para lacapa intermedia

```

g2=imadjust (g, [0.5 0.75], [0 1]); % expansión de grises
entre 0.5 y 0.75 a [0 1]

```

%figure,imshow(g2);

```

Im_bin2=im2bw(g2);
[filas2,columna2]= size(Im_bin2);

```

%conteo de porosidad para la capa fondo

```

porosidad2 = 0;
for i=1:filas2
    for j=1:columna2
        valor= Im_bin2(i,j);
        if valor==1
            porosidad2 = porosidad2 + 1;
        else
            end
        end
    end
end

```

% porcentaje de porosidad capa

```

pixeles2= filas2 * columna2
porosidad2
porcentaje2 = (porosidad2/pixeles2)*100

```

% filtrado laplaciano para capa superior

```

w=fspecial('laplacian',0);
g3=imfilter(f,w,'replicate');
Im_bin3=im2bw(g3);
[filas3,columna3]= size(Im_bin3);

```

%conteo de porosidad para la capa fondo

```

porosidad3 = 0;
for i=1:filas2
    for j=1:columna2
        valor= Im_bin3(i,j);
        if valor==1
            porosidad3 = porosidad3 + 1;
        else
            end
        end
    end
end

```

#### % porcentaje de porosidad capa

```
pixeles3= fila3 * columna3
porosidad3
porcentaje3 = (porosidad3/pixeles3)*100
```

#### 6.3.4 Sección (D) del diagrama

Conociendo los porcentajes de porosidad de cada capa se calcula la porosidad promedio por medio de la siguiente parte del algoritmo.

```
porcentaje= [porcentaje1, porcentaje2, porcentaje3]
ValorPromedio=average(porcentaje)
```

**%promedio2=( porcentaje2 + porcentaje1 + porcentaje3)/3**

#### 6.3.5 Sección (E) del diagrama

En esta parte el algoritmo se define variables las cuales tienen que ser ingresadas por el usuario como lo es “Largo de la muestra o imagen, Ancho de la muestra o imagen, Profundidad de la muestra, Valor de escala según la estipulada en la imagen y su pixel inicial y final en esa escala en el eje X”. Estos valores se obtienen con ayuda de una herramienta de Matlab disponible en el cuadro de la imagen la opción **Data cursor**, en la cual se ubica el cursor sobre el pixel que se desea obtener información en la imagen y esta función proporciona la información de su ubicación espacial en el eje X y Y, conociendo así el valor para poder ser ingresado en el algoritmo. Las características de la imagen nombradas anteriormente se definen en el código como Largopix, Anchopix, Profundidad, Esca, pixel11 y pixel22 respectivamente.

```
pixel11 = input('pixel inicial de la escala: ');
pixel22 = input('pixel final de la escala: ');
Esca = input('valor de la linea blanca en escala
unicamente numero: ');
Largopix=input('Largo de la imagen en pixeles: ');
Anchopix= input('Ancho de la imagen en pixeles: ');
Profundidad= input('Profundidad: ');
pixeltot= pixel22-pixel11;
pixmed= pixeltot / Esca;
errorpix = 0.5;
```

```
Cantidad_de_pixeles_que_presentes_en_la_longitud_de_la
medida=pixeltot;
Incertidumbre_de_la_medida= errorpix;
errorpixtometpor= sqrt(((errorpix/pixeltot)*100)^2));
errorpixtomettot=((pixmed*errorpixtometpor)/100);
info_escal = [ pixmed, errorpixtomettot];
```

Valor\_de\_pixel\_por\_unidad\_de\_escal\_a\_e\_incertidumbre=info\_escal\_a

Se implementan las fórmulas de conversión de unidades para pasar de pixeles a una escala longitudinal las características de la imagen en el código de Matlab por medio del siguiente código siendo igual para las características de largo, ancho y profundo variando únicamente el valor que se mide en la imagen y su incertidumbre en algunos casos de esta manera es posible hallar sus características en medidas de longitud en este caso inicialmente en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).

```
%-----Largo
x= Largopix/pixmed;

errorlargpor=
sqrt(((errorpix/Largopix)*100)^2)+(((errorpixmettot/pixmed)*100)^2));
errorlarg=(x*(errorlargpor/100));
errorlarg=round(errorlarg);
Largo_de_la_imagen_en_la_unidad_utilizada_e_incertidumbre=[
x,errorlarg]

%----- Ancho
y= Anchopix/pixmed;

erroranchpor=
sqrt(((errorpix/Anchopix)*100)^2)+(((errorpixmettot/pixmed)*100)^2));
erroranch=(y*(erroranchpor/100));
erroranch=round(erroranch);
Ancho_de_la_imagen_en_la_unidad_utilizada_e_incertidumbre=[
y,erroranch]

%----- Profundo

z=Profundidad;
errorprofundopor=0.5;
%sqrt(((errorpixmettot/pixmed)*100)^2));
errorprof=(z*(errorprofundopor/100));
% errorprof=round(errorprof,1);
Profundidad_de_la_imagen_en_la_unidad_utilizada_e_incertidumbre=[z,errorprof]
```

### 6.3.6 Sección (G) del diagrama

Se calcula el volumen total y el volumen libre por medio de las ecuaciones explicadas en la sección 8,3 en este caso el volumen inicial se da en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).

```

%----- Volumen
errorvolpor=
sqrt(((errorlarg/x)*100)^2)+(((erroranch/y)*100)^2)+(((error
prof/z)*100)^2));
Volumentot = (x* y * z);
errorvol=(Volumentot*(errorvolpor/100));
errorvol=round(errorvol);
N=(ValorPromedio/100);
V=(Volumentot1 * N);
WS=(V*(po/100));
Volumen_libre_de_la_muestras_en_mm3_e_incertidumbre=[V,WS]

```

### 6.3.7 Sección (F) del diagrama

Esta parte hace la conversión de unidades que se encontraban den (µm) y lo pasa a milímetros (mm), esto se da con el propósito de manejar una mejor escala y sea más fácil el procesamiento y entendimiento de los datos obtenidos.

```

%----- conversión de unidades a milímetros

%largo
a=1000;
g=(x/a);
h=(errorlarg/a);
Largo_de_la_imagen_en_milímetros_e_incertidumbre=[g,h]

%ancho
k=(y/a);
l=(erroranch/a);
Ancho_de_la_imagen_en_milímetro_e_incertidumbre=[k,l]

%profundo
n= (z/a);
m= (erroranch/a);
Profundidad_de_la_imagen_en_milímetro_e_incertidumbre=
[n,m]

%volumen
Volumentot1 = (g* k * n);
errorvol2por=sqrt(((h/g)*100)^2)+(((m/n)*100)^2)+(((1/
k)*100)^2));
errorvol2= (Volumentot1*(errorvol2por/100));

% errorvol1=round (errorvol1);
Volumen_de_la_muestra_en_la_imagen_e_incertidumbre_en_
mm=[Volumentot1,errorvol2]

```



Conociendo ya los valores del material se procede amostrar las imágenes de cada una de las etapas y cuál fue el resultado final en las imágenes por medio del siguiente código.

### 6.3.8 Sección (H) del diagrama

#### Visualización de imágenes

```
% visualización original
figure(1)
subplot(4,1,1); imshow(f), title('Imagen Original');
subplot(4,1,2); imshow(fR),title('SegmentosRojos')
subplot(4,1,3); imshow(fG),title('Segmentos Verdes');
subplot(4,1,4); imshow(fB),title('SegmentosAzules');

% visualizaciónfiltros
Figure (2)
subplot(4,1,1); imshow(f), title('Imagen original');
subplot(4,1,2); imshow(media2),title('FiltroGaussiano');
subplot(4,1,3); imshow(fero),title('Filtro Medio');
subplot(4,1,4); imshow(fdil),title('FiltroDilatado');

%vizulizacionextracion capas
Figure (3)
subplot(4,1,1); imshow(f), title('Imagen original');
subplot(4,1,2); imshow(g),title('Fondo');
subplot(4,1,3); imshow(g2),title(' Medio');
subplot(4,1,4); imshow(g3),title('Superior');

%vizulizacionextracion capas binarizadas
Figure(4)
subplot(4,1,1); imshow( Im_bin), title('Imagen original');
subplot(4,1,2); imshow(Im_bin1),title('Fondo');
subplot(4,1,3); imshow(Im_bin2),title(' Medio');
subplot(4,1,4); imshow(Im_bin3),title('Superior');
```

Por medio del código anteriormente descrito fue posible medir la cantidad de pixeles totales presentes en la imagen, el porcentaje de poro para cada capa, también se evidencia el zoom de cada muestra, su unidad de longitud, en que pixel empieza y en cual termina, el valor que muestra la unidad de longitud en la imagen y sus dimensiones de largo, ancho y profundo de la muestra; seguido de esto se muestran los datos obtenidos como porcentaje de porosidad por capa, valor numérico de un pixel en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), porcentaje total de la muestras, volumen del material, volumen libre y las incertidumbres de cada medida expresado en milímetros cúbicos ( $\text{mm}^3$ ).

#### 6.4 Obtención de las muestras de los biomateriales.

Scaffold de copolímeropoli D, L-láctico-co-glicólico (PLGA): Estas muestras fueron elaboradas por el grupo de investigación UIBO por parte de las siguientes investigadoras; Catalina Colorado y la Dra. Sandra Perdomo, entre el periodo de 2015 a 2016.

Matriz extracelular de intestino delgado de cerdo, estas muestras se adquirieron de la empresa 3Biomat la cual desarrolla estas películas delgadas con diferentes espesores dependiendo de su aplicabilidad.

Scaffold Hidroxiapatita con estudio biológico de biocompatibilidad: La biocompatibilidad de esta matriz fue evaluada con la línea celular de osteoblastos Saos-2 (ATCC) las células fueron descongeladas y expandidas *in vitro* utilizando en medio de cultivo DMEM-F12 con 10% de SFB, 200µg/mL de penicilina y 200µg/mL de estreptomicina posteriormente las matrices porosas fabricadas se esterilizaron con óxido de etileno y se sembraron  $1 \times 10^6$  osteoblastos por matriz. Las matrices se mantuvieron en medio de cultivo DMEM-12 suplementado durante 7 y 15 días y se realizó cambio de medio 2 veces a la semana (Rezaei & Mohammadi, 2013).

El protocolo anteriormente descrito fue implementado por el grupo de investigación UIBO para el análisis *in vitro* de los scaffold desarrollados por ellos.

Las imágenes fueron tomadas con ayuda del grupo de investigación de Virología de la Universidad El Bosque en un microscopio ZEISS Image.A2 que se encuentra bajo la supervisión de este grupo.

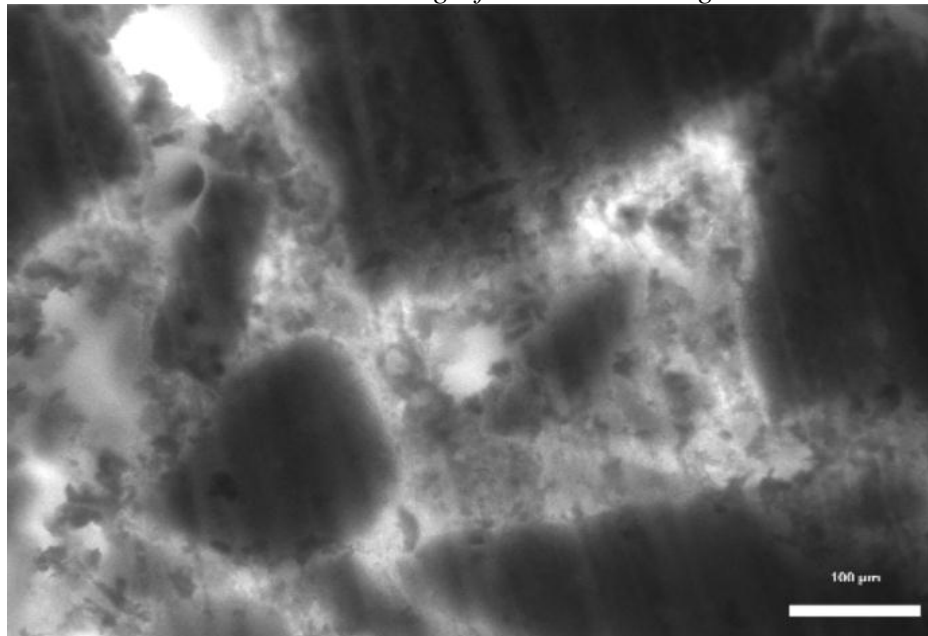
#### 6.5 Imágenes obtenidas

##### 6.5.1 Muestra PLGA

##### *Matriz PLGA muestra 1 zoom 20X*

La muestra se trabaja para obtener los datos de la *Tabla 8* en la columna nombrada “1 20X PLGA” correspondiente a la imagen de la matriz de PLGA a un zoom de 20X en el microscopio y es la primera de sus tomas siendo la muestra 1.

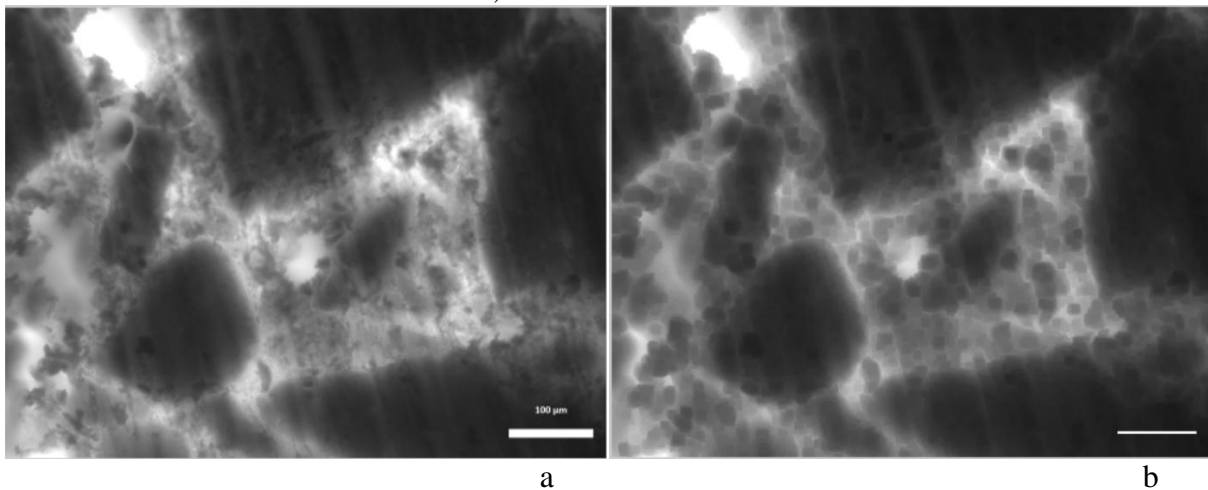
*Ilustración 31 Micrografía de PLGA Original.*

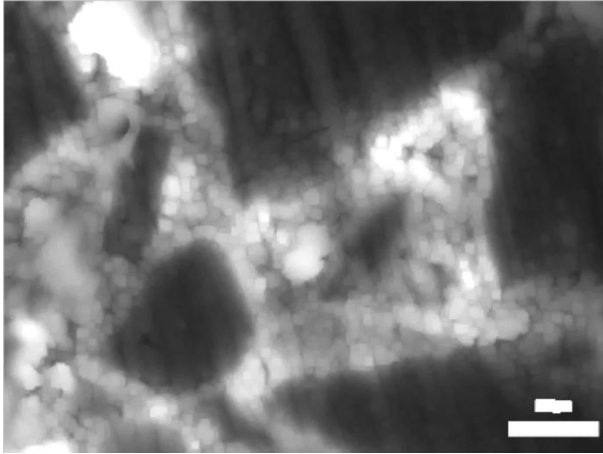


*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

Al cargarse la imagen el en código se obtienen inicialmente los plano RGB de la imagen donde se muestran las distintas tonalidades en color, en este caso al encontrarse las muestras en escala de grises no se ve una variación significativa en la imagen, debido a esto estas imagen se muestran porque todas son iguales a la imagen original de PLGA. Seguido de esto se tienen en cuenta los resultados obtenidos por la filtración en cada una de sus capas.

*Ilustración 32 Micrografía de PLGA muestra 1 a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.*



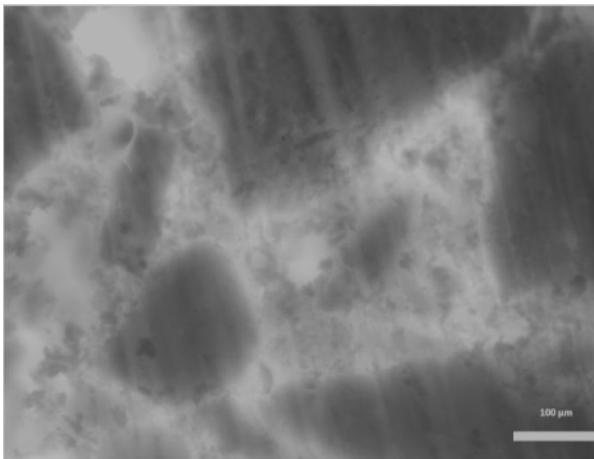


c

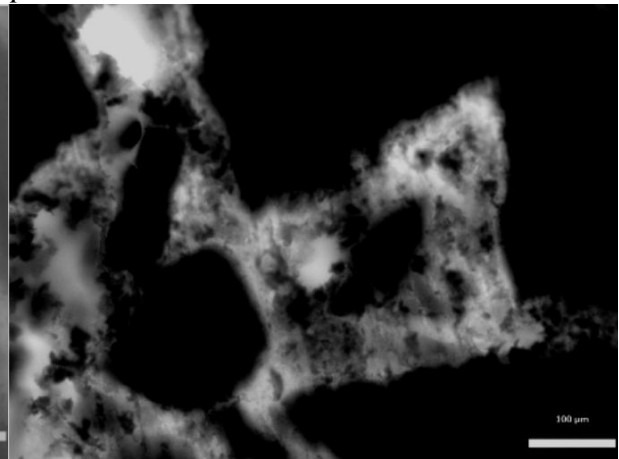
*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

Como se mencionó en la explicación del algoritmo sección (C) se implementa el filtro Gaussiano, medio y imdilate e imerode, Aquí es posible diferenciar como se trata la imagen observando la escala de medida que tiene cada una de las imágenes. En la *ilustración 32*, imagen *a* se muestran con mejor definición características finas, es decir, se identifican puntos de diferencia entre partes sólidas y lugares donde hay porosidad en la muestra. En la imagen *b* se logra observar que los valores tomados por el filtrado manejan tonalidades grises los cuales sufren un cambio en la imagen, de esta manera se eliminan pintos ya medidos en el filtro anterior y se procede a identificar los que se encuentran en esta parte del procesamiento; por último se usa el dilatado lo cual genera un desenfoque en la imagen, esto con el fin de identificar las porosidades superiores de la imagen sin tener en cuenta la parte borrosa de la imagen, calculada por los filtros anteriores.

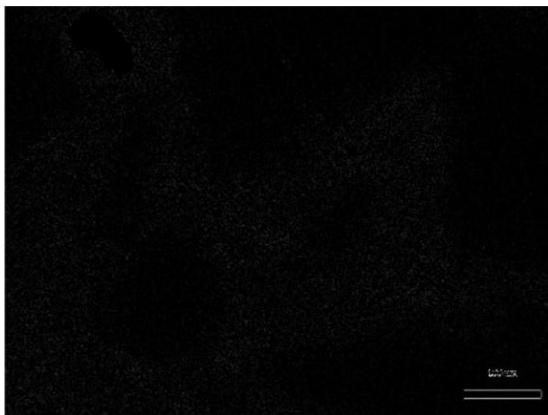
*Ilustración 33 Micrografía de PLGA muestra 1 a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.*



a



b

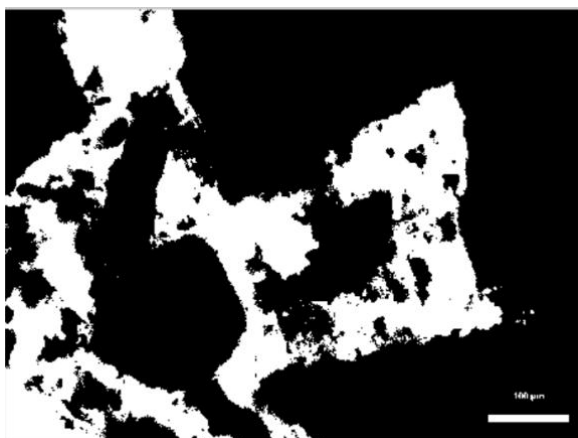


c

*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

Según los filtros utilizados en las etapas anteriores y descritos en la *ilustración 32* los datos obtenidos en estas capas intensifican su color causando los siguientes resultados en cada una de las imágenes que se muestran en la *ilustración 33*. En la imagen **a** se aprecia la capa inferior y su intensificación debido al filtro Gaussiano, el cual toma una tonalidad muy clara en la permitiendo ver donde se encuentran las partes sólidas siendo una tonalidad de gris y sus espacios las partes blancas. A diferencia de la imagen **b** en la cual al momento en que se realiza el contraste en la imagen se observan las partes oscuras dentro de la imagen permitiendo identificar de manera más sencilla las partes sólidas de la muestra y las porosidades que se encuentran en este segundo plano. Finalmente en la imagen **c** no se logra identificar una porosidad tan alta como en los planos inferior y medio aunque se identifican pequeños puntos de poros en la muestra.

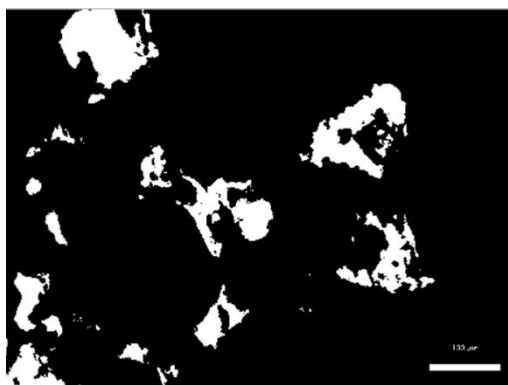
*Ilustración 34 Micrografía de PLGA muestra 1 a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.*



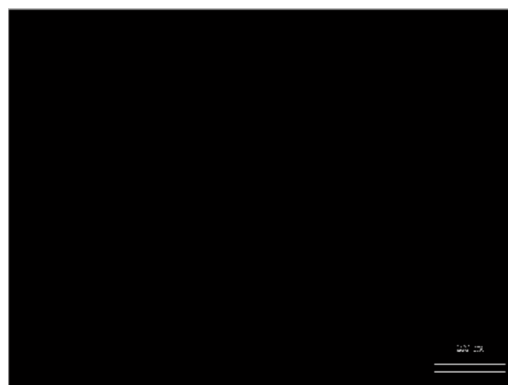
a



b



c



d

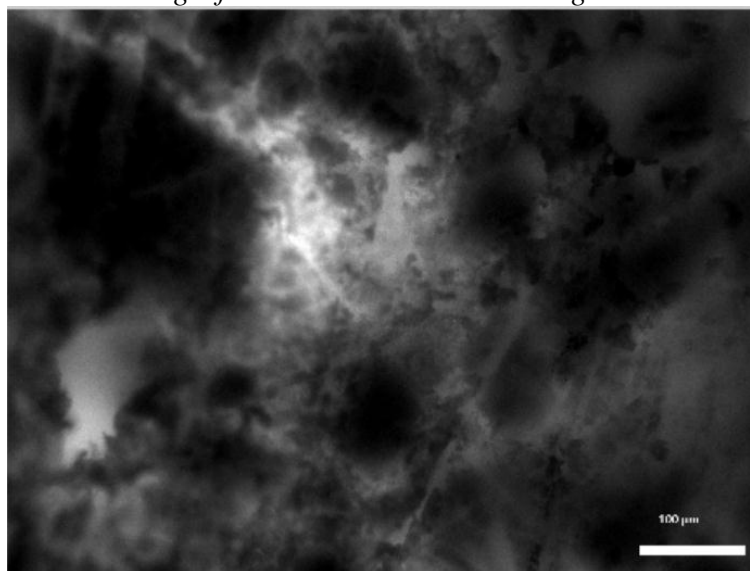
*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

Una vez realizado el estudio de los tres diferentes planos, se procede a binarizar los resultados de la *ilustración 33* en donde se obtienen las imágenes de la *ilustración 34*, las cuales se encuentran entre valores de 0 y 1 como se puede observar en las imágenes **b**, **c** y **d** correspondientes a las diferentes capas.

Estos mismos procedimientos se muestran para las imágenes de las muestras correspondientes a la matriz de cerdo extracelular. Para las imágenes de Hidroxiapatita con osteoblastos se realiza una breve explicación más adelante.

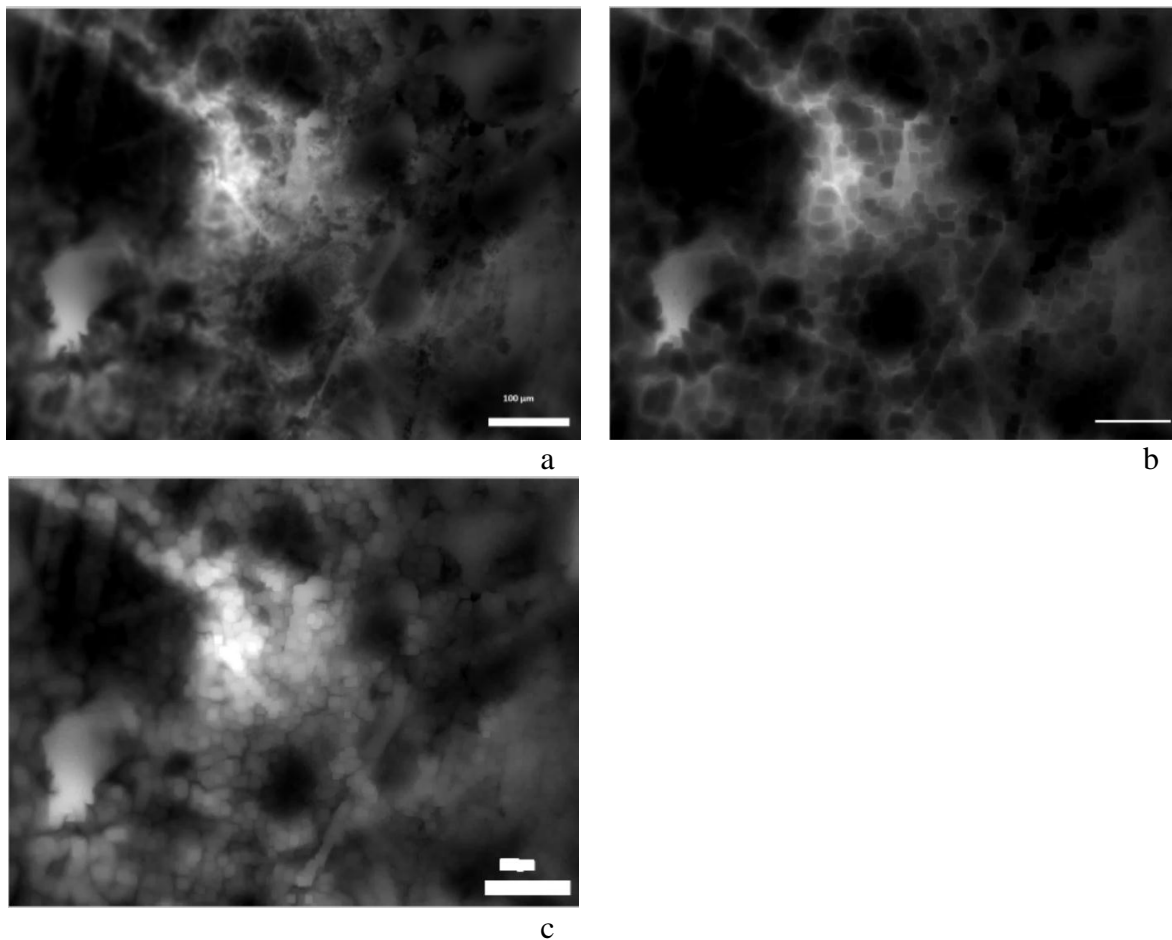
*Muestra 4 zoom 20X PLGA*

*Ilustración 35 Micrografía de PLGA muestra 4 Imagen de PLGA Original*



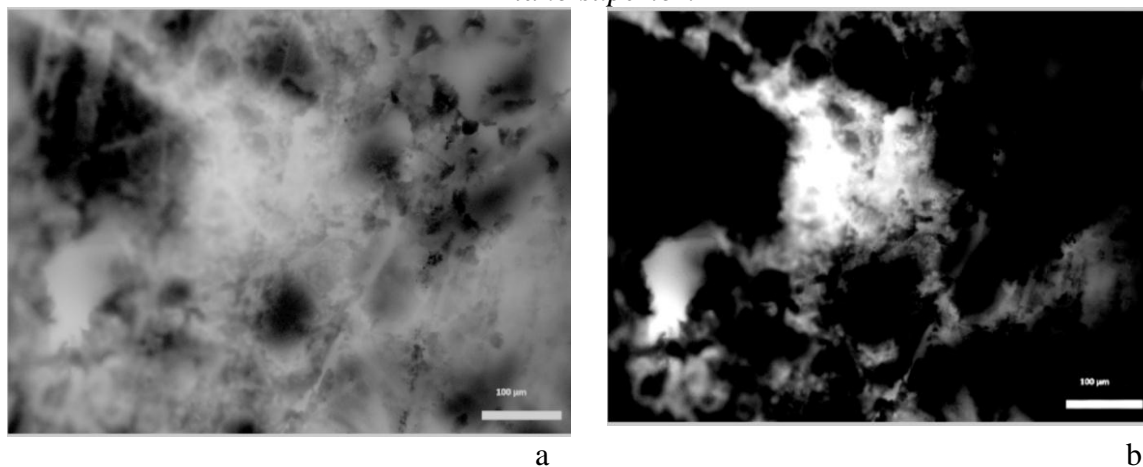
*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

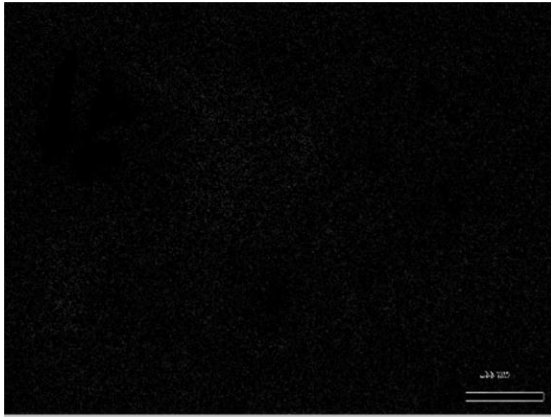
*Ilustración 36 Micrografía de PLGA muestra 4 a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.*



*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

*Ilustración 37 Micrografía de PLGA muestra 4 a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.*





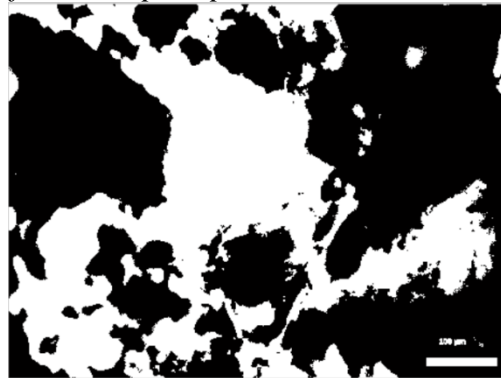
c

*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

*Ilustración 38 Micrografía de PLGA muestra 4 a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.*



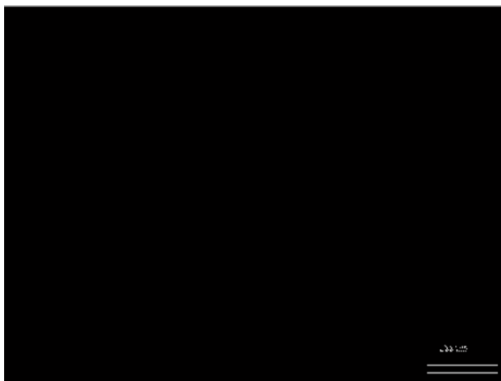
a



b



c



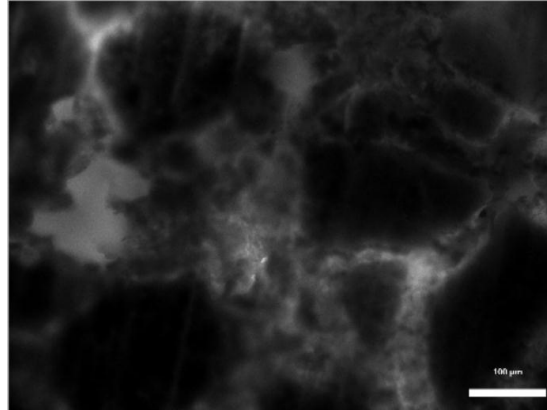
d

*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*



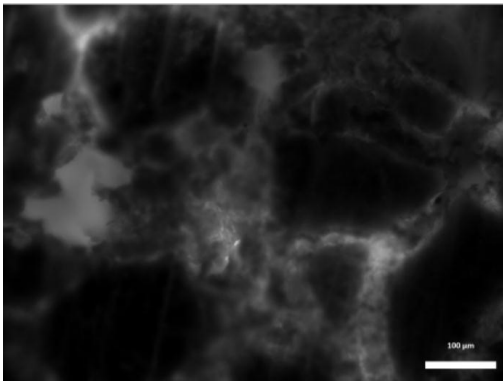
*Muestra 5 zoom 20X PLGA*

*Ilustración 39 Micrografía de PLGA muestra 5 Imagen de PLGA Original.*

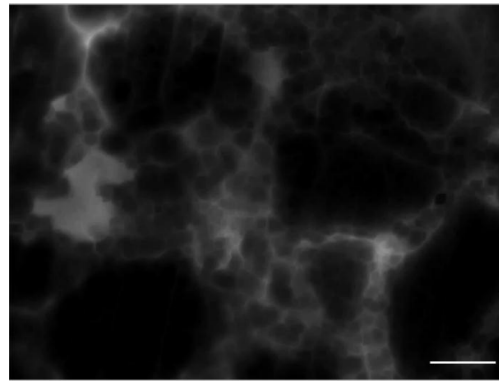


*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

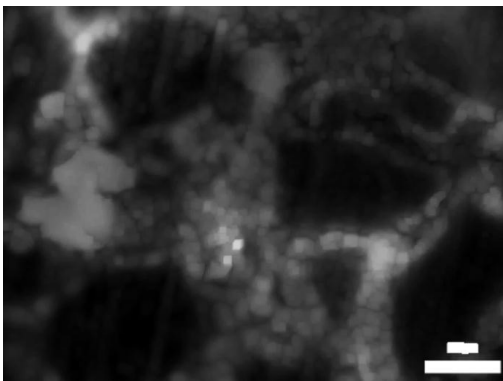
*Ilustración 40 Micrografía de PLGA muestra 5 a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado*



a



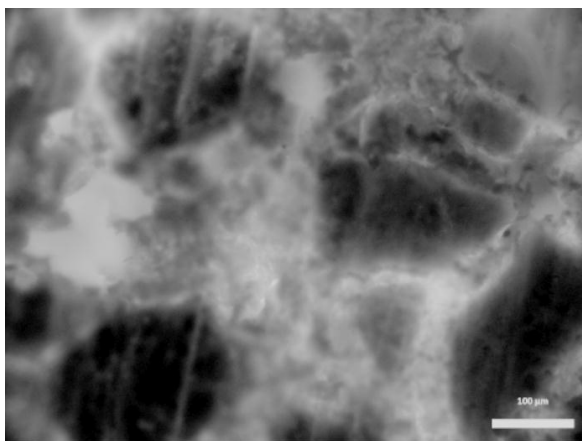
b



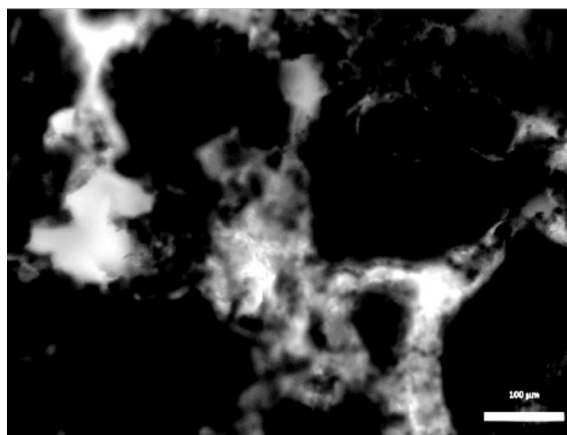
c

*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

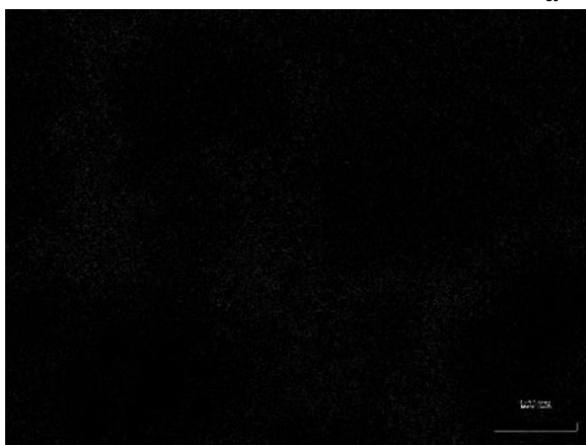
*Ilustración 41 Micrografía de PLGA muestra 5 a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.*



a



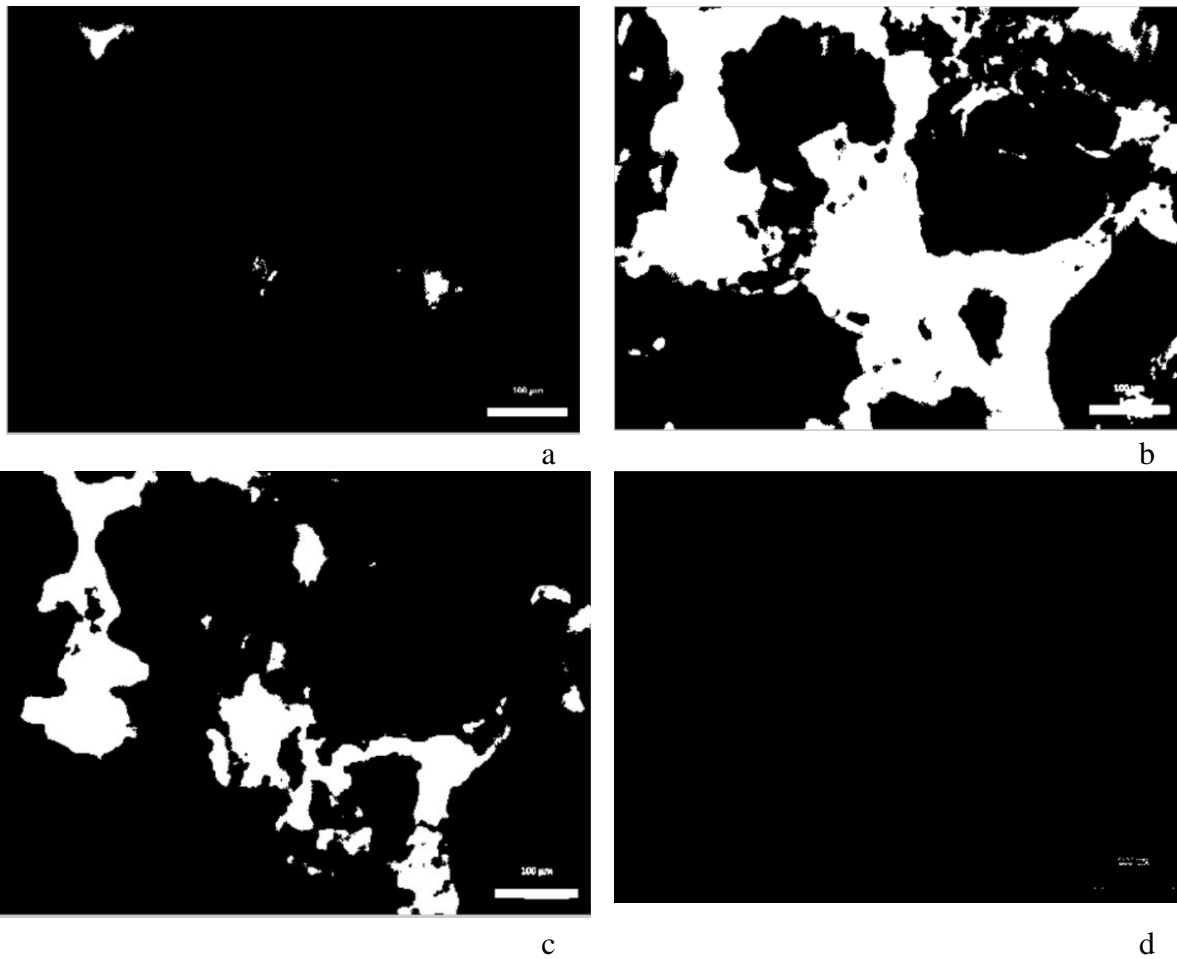
b



c

*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

*Ilustración 42 Micrografía de PLGA muestra 5 a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.*

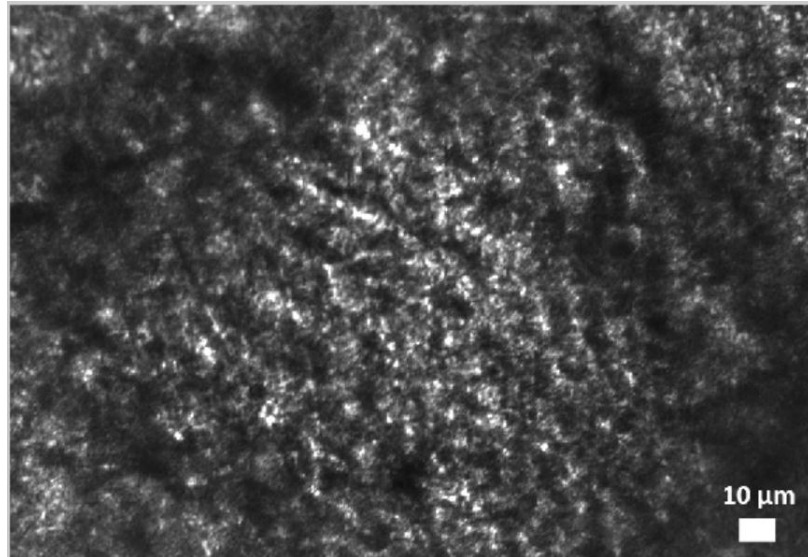


*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

### 6.5.2 Muestra Matriz extracelular de cerdo

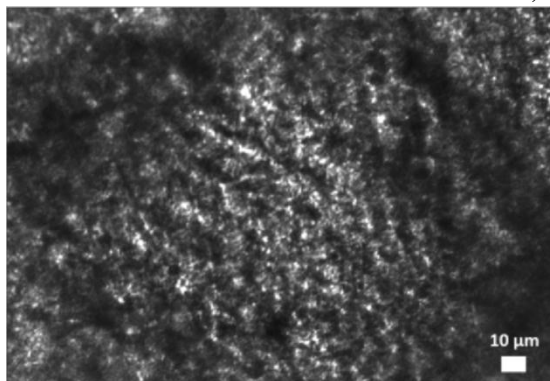
#### Muestra 1 zoom 40X Matriz extracelular de cerdo

*Ilustración 43 Micrografía de Matriz extracelular muestra 1 Imagen Original.*

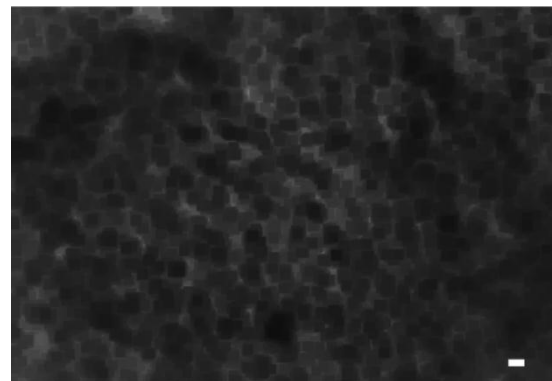


*Fuente. Tomado de (Francisco Ibla, 2016).*

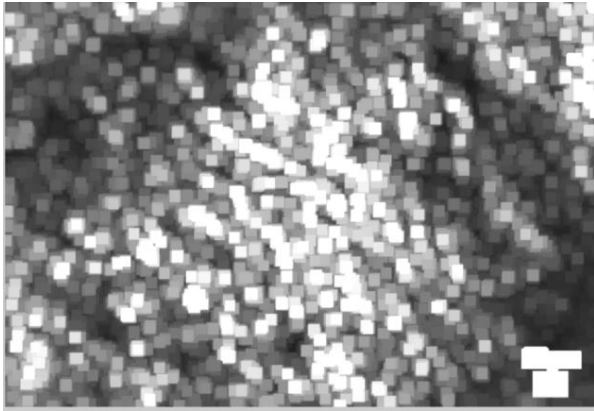
*Ilustración 44 Micrografía de Matriz extracelular muestra 1 a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.*



a



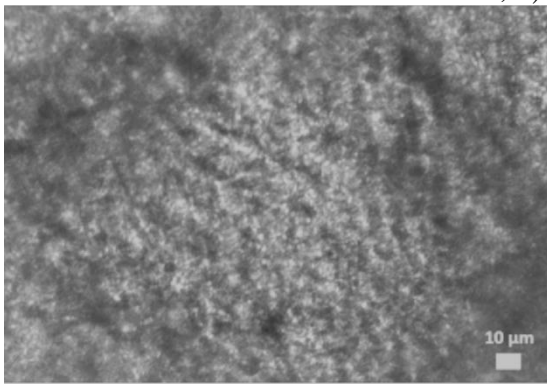
b



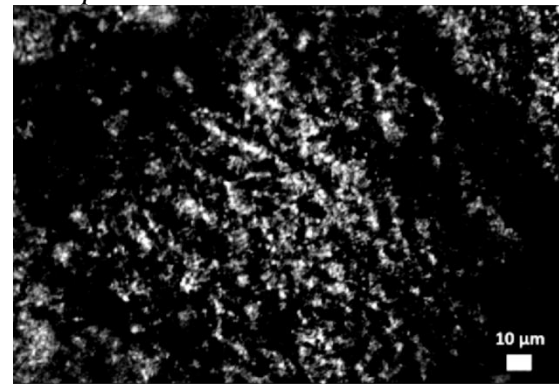
c

*Fuente. Tomado de (Francisco Ibla, 2016).*

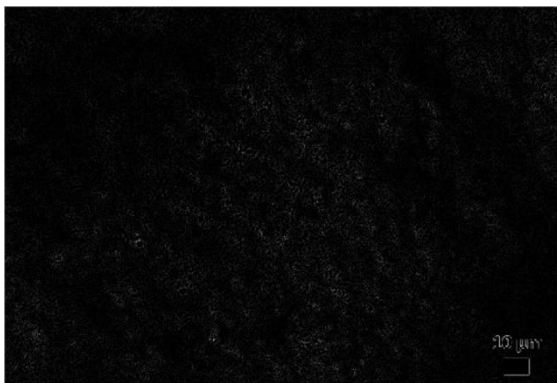
*Ilustración 45 Micrografía de Matriz extracelular muestra 1 a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.*



a



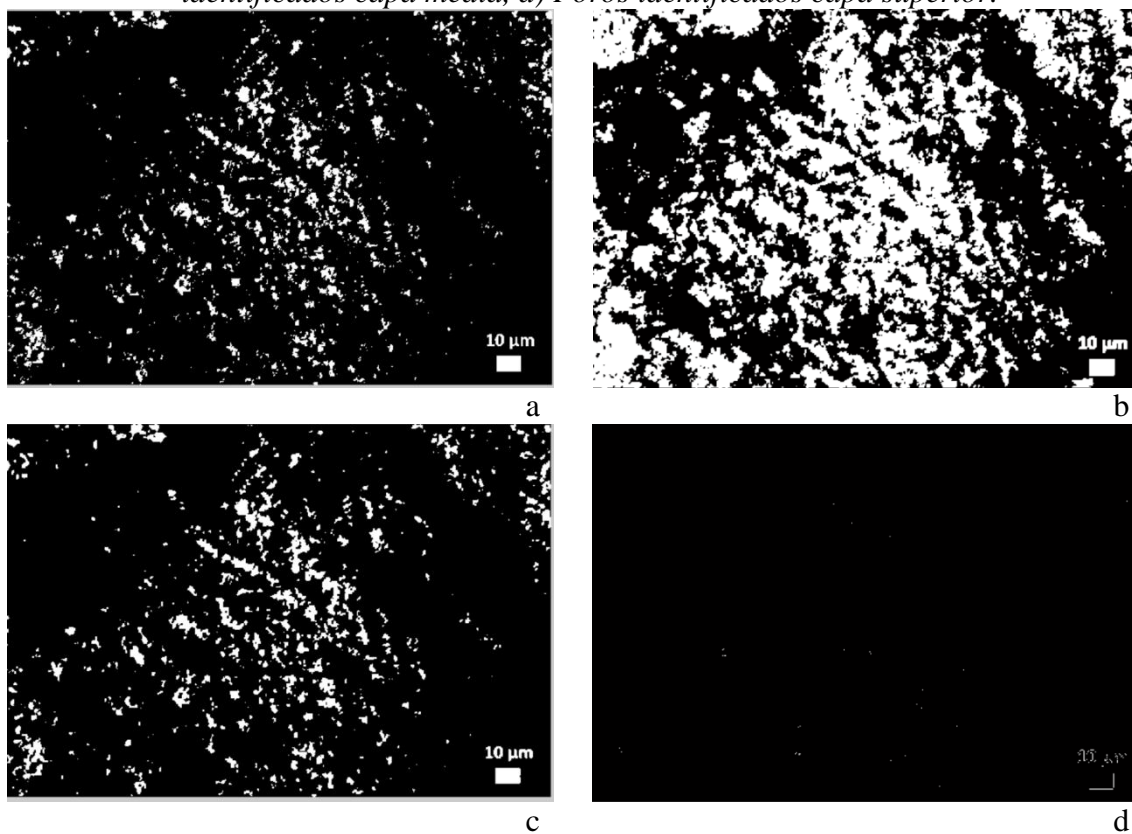
b



c

*Fuente. Tomado de (Francisco Ibla, 2016).*

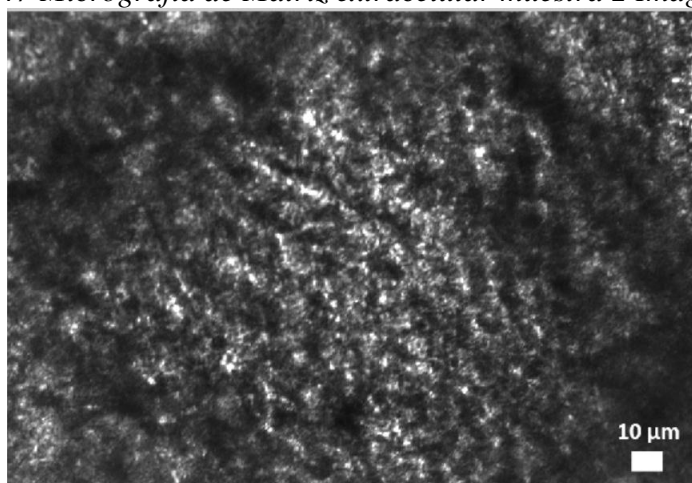
*Ilustración 46 Micrografía de Matriz extracelular muestra 1 a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.*



*Fuente. Tomado de (Francisco Ibla, 2016)*

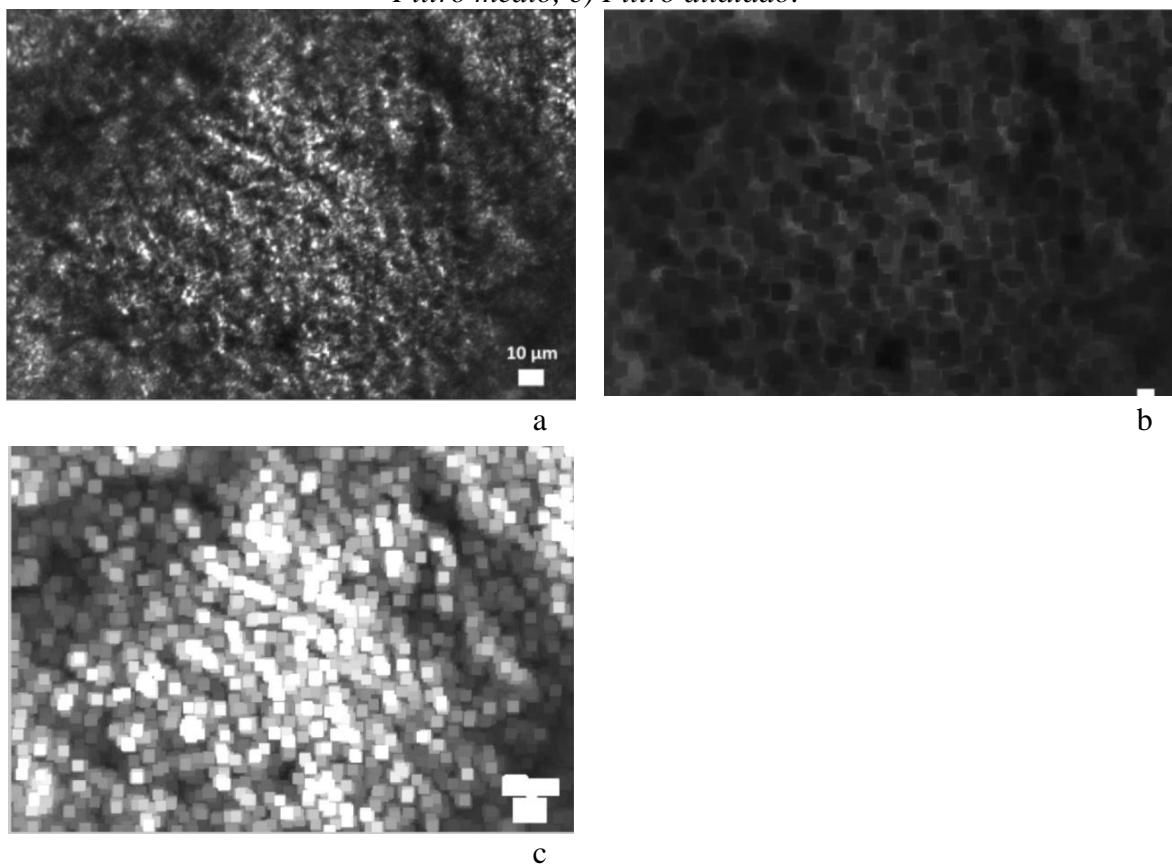
*Muestra 2 zoom 40X Matriz extracelular de cerdo*

*Ilustración 47 Micrografía de Matriz extracelular muestra 2 Imagen Original.*



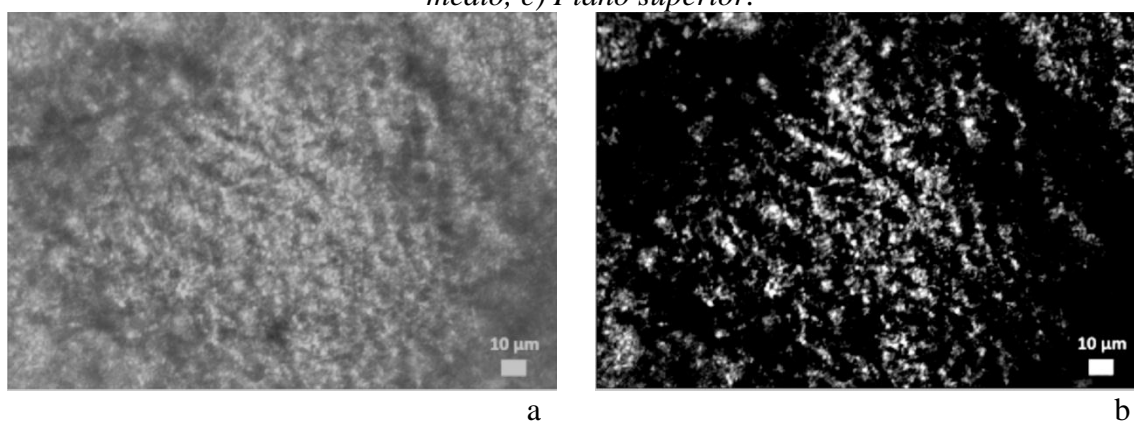
*Fuente. Tomado de (Francisco Ibla, 2016).*

*Ilustración 48 Micrografía de Matriz extracelular muestra 2 a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.*

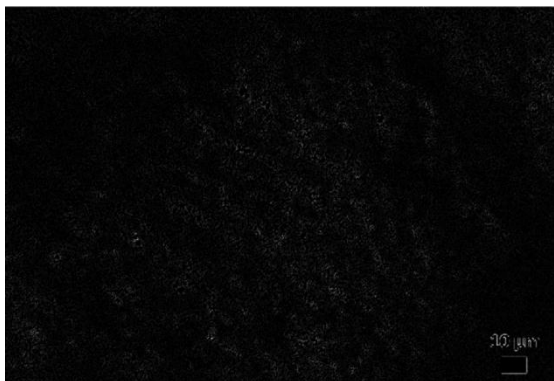


*Fuente. Tomado de (Francisco Ibla, 2016).*

*Ilustración 49 Micrografía de Matriz extracelular muestra 2 a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.*



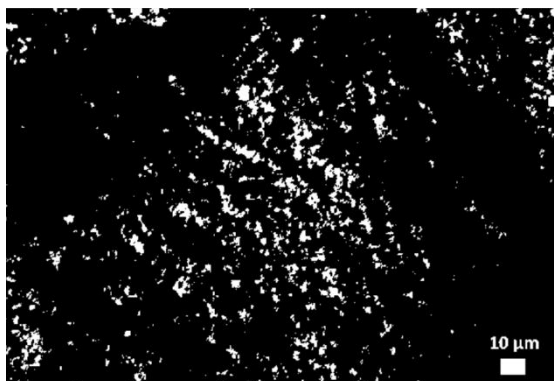




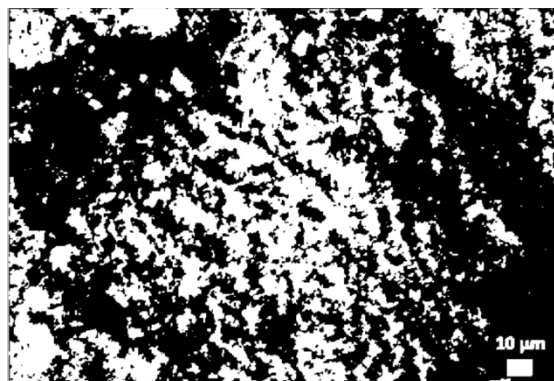
c

*Fuente. Tomado de (Francisco Ibla, 2016).*

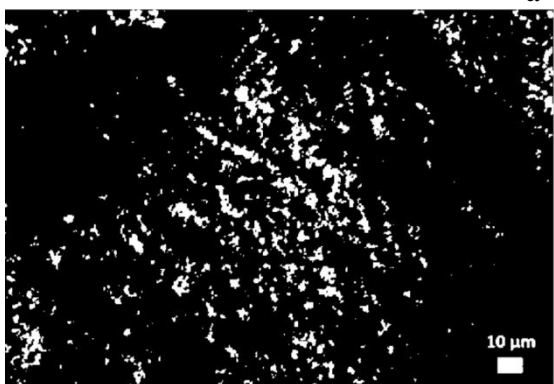
*Ilustración 50 Micrografía de Matriz extracelular muestra 2 a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.*



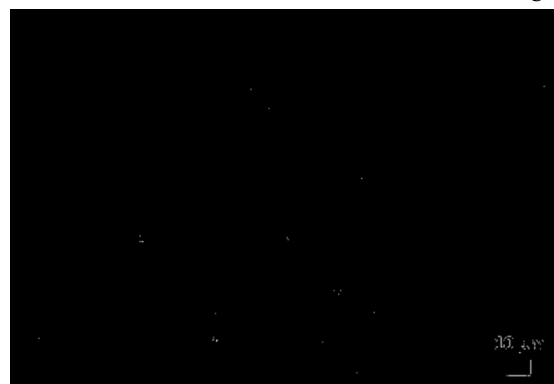
a



b



c



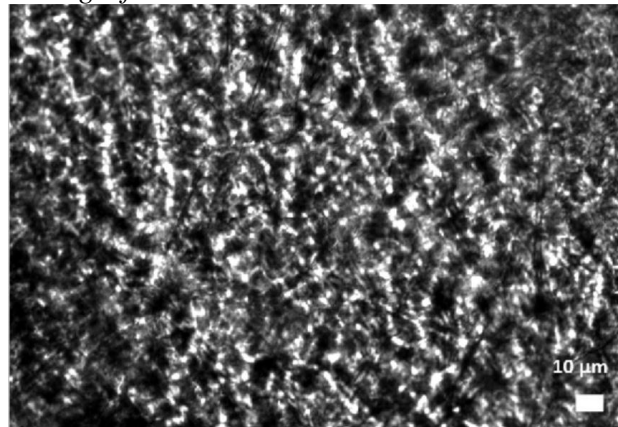
d

*Fuente. Tomado de (Francisco Ibla, 2016).*

*Muestra 3 zoom 40X Matriz extracelular de cerdo.*

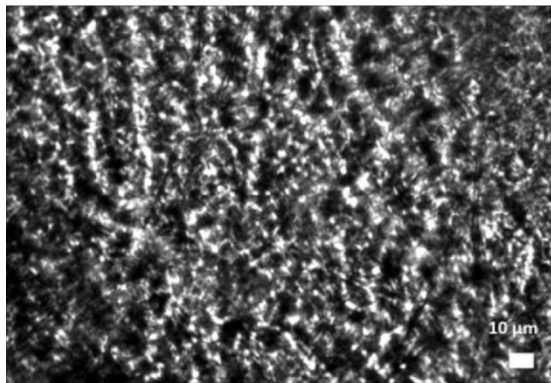


*Ilustración 51 Micrografía de Matriz extracelular muestra 3 Imagen Original*

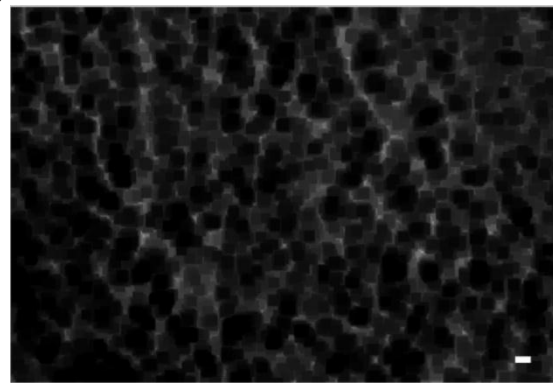


*Fuente. Tomado de (Francisco Ibla, 2016)*

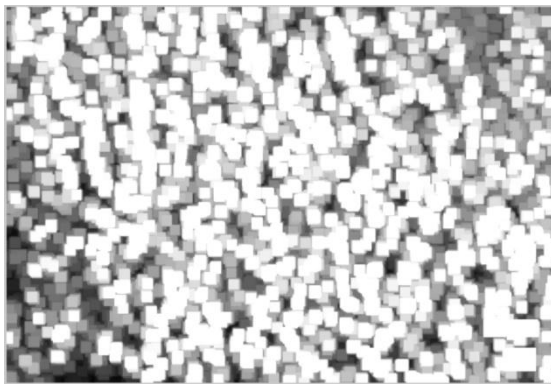
*Ilustración 52 Micrografía de Matriz extracelular muestra 3 a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado*



a



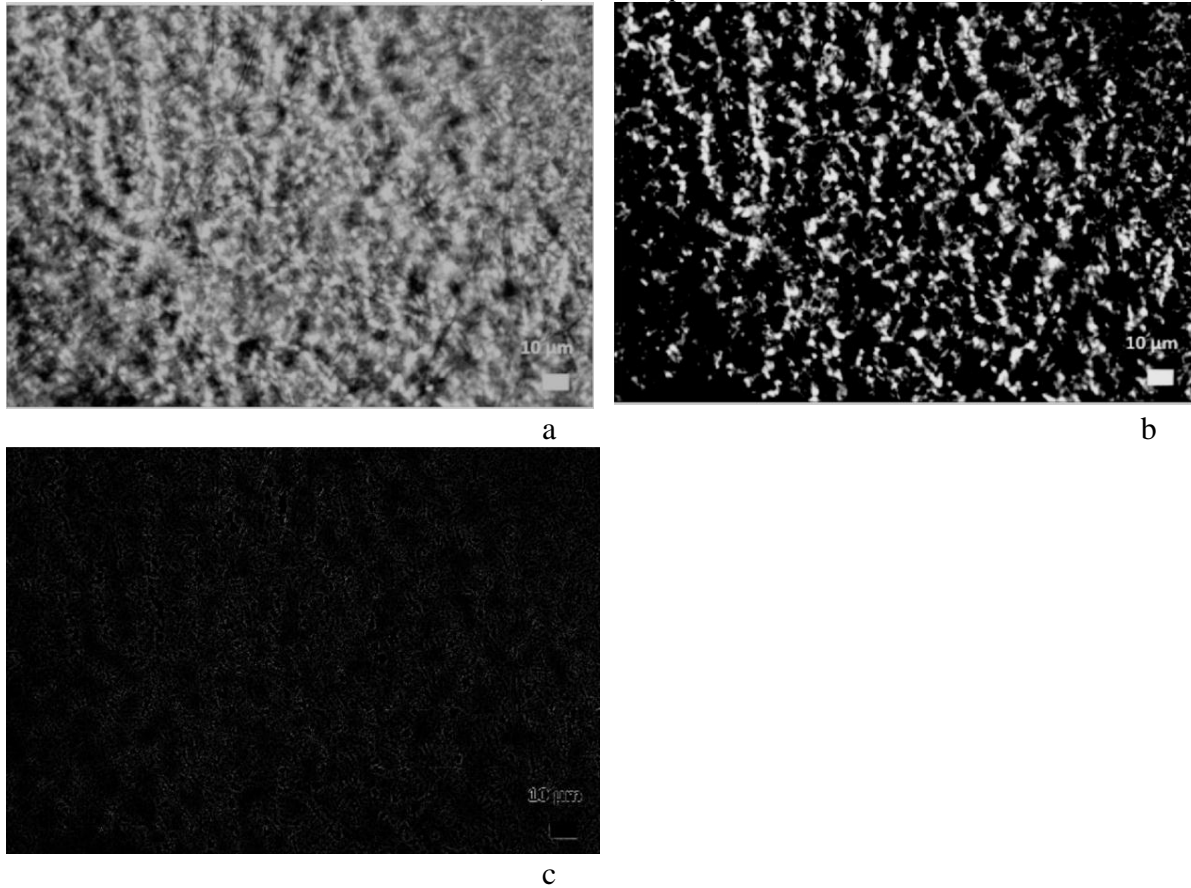
b



c

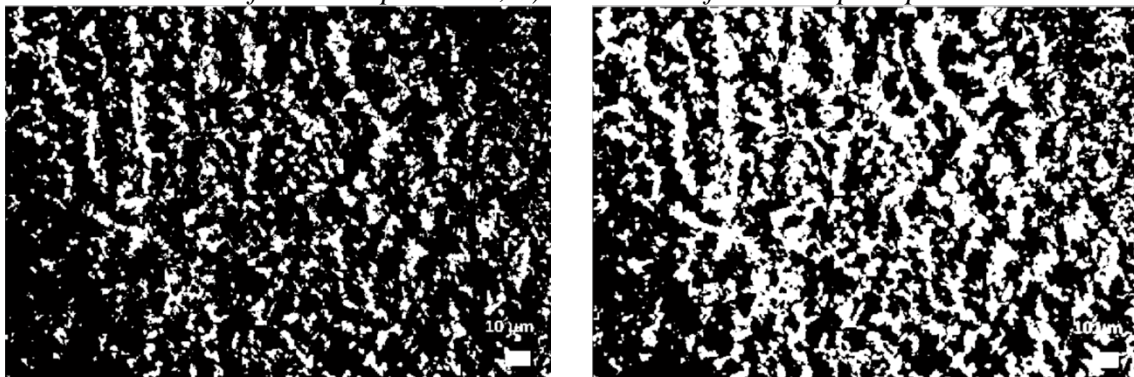
*Fuente. Tomado de (Francisco Ibla, 2016)*

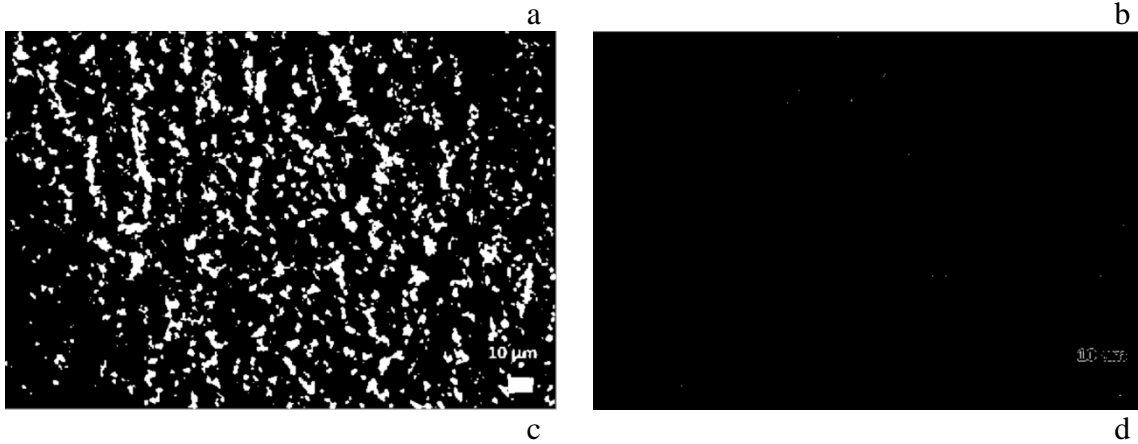
*Ilustración 53 Micrografía de Matriz extracelular muestra 3 a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.*



*Fuente. Tomado de (Francisco Ibla, 2016).*

*Ilustración 54 Micrografía de Matriz extracelular muestra 3 a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.*





Fuente. Tomado de (Francisco Ibla, 2016).

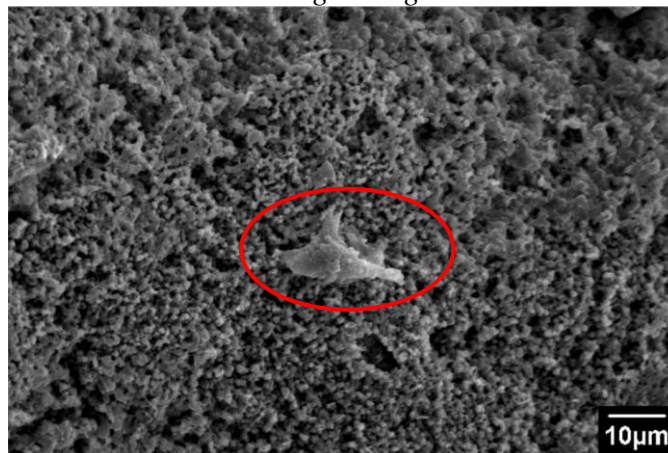
### 6.5.3 Muestra Hidroxiapatita con osteoblastos

Las imágenes que se muestran en esta parte del proyecto se tomaron a los 5 días del estudio *in vitro* desarrollado por el grupo de investigación UIBO.

En esta parte de los resultados fue necesaria una leve modificación del algoritmo debido a que las imágenes estudiadas se obtuvieron por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM). En estas los puntos oscuros se toman como poros, en base a esto se adaptó el algoritmo para identificar estos puntos y seguir su procesamiento normalmente. Las imágenes obtenidas como resultado se muestran a continuación. La aclaración del porque el cambio de método en la obtención de estas imágenes se especifica en la discusión.

*Muestra Hidroxiapatita con osteoblastos muestra 1 con un zoom de 1100x*

*Ilustración 55 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1 a un zoom 1100x imagen original.*

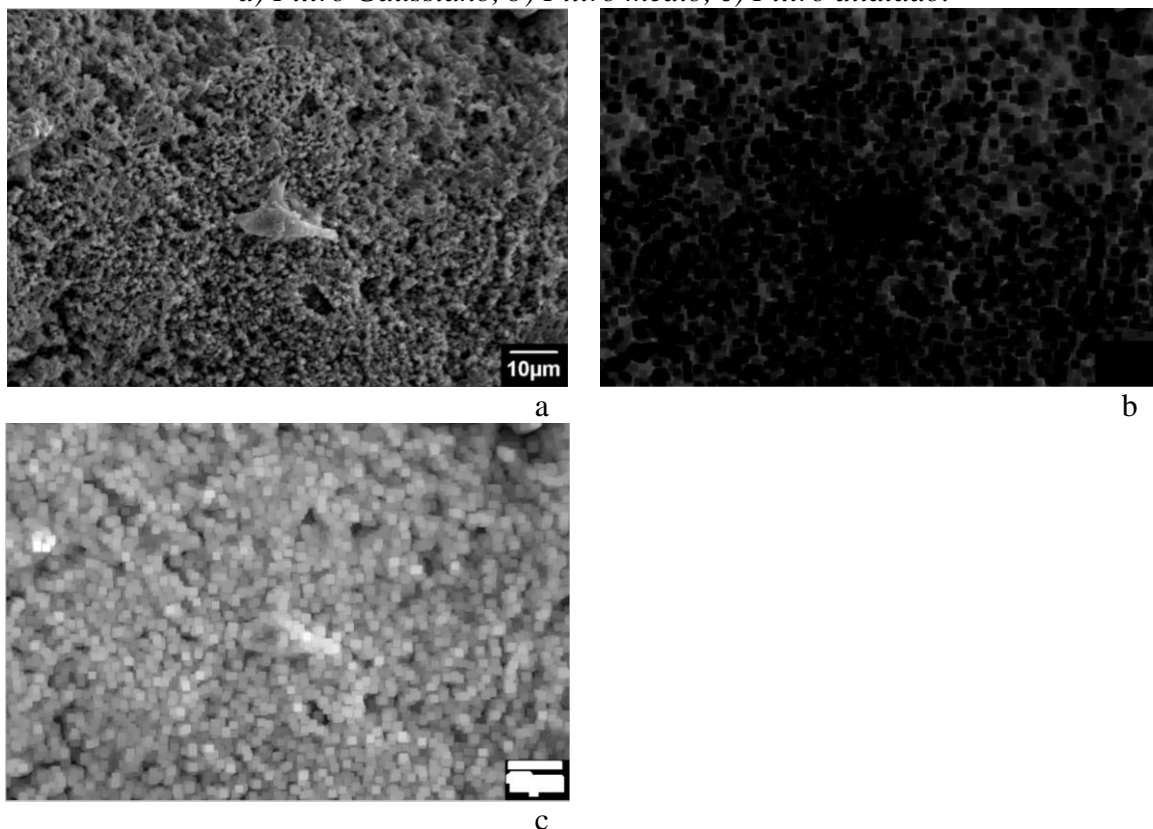


Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).

En la *Ilustración 55* Se muestra una micrografía de microscopía electrónica de barrido con un zoom de 1100x y una escala de 10 micrómetros en la cual se manifiesta la

morfología del scaffold elaborado con Hidroxiapatita que fue sometido a el estudio biológico *in vitro* usando una línea de osteoblastos. En ella se observa a la célula sobre la superficie del material evidenciando procesos de adhesión debido a sus extensiones citoplasmáticas lo que evidencia la funcionalidad biológica del material después de 7 días del estudio *in vitro*. Por medio del algoritmo desarrollado y el análisis es necesario descartarlos osteoblastos presentes para poder realizar la medición de porosidad en la muestra por esto en las ilustraciones que se verán a continuación se verá como en el análisis esta sección es descartada de la toma de datos y se observaran los datos obtenidos de esta análisis en la *Tabla 10* de la sección de resultados.

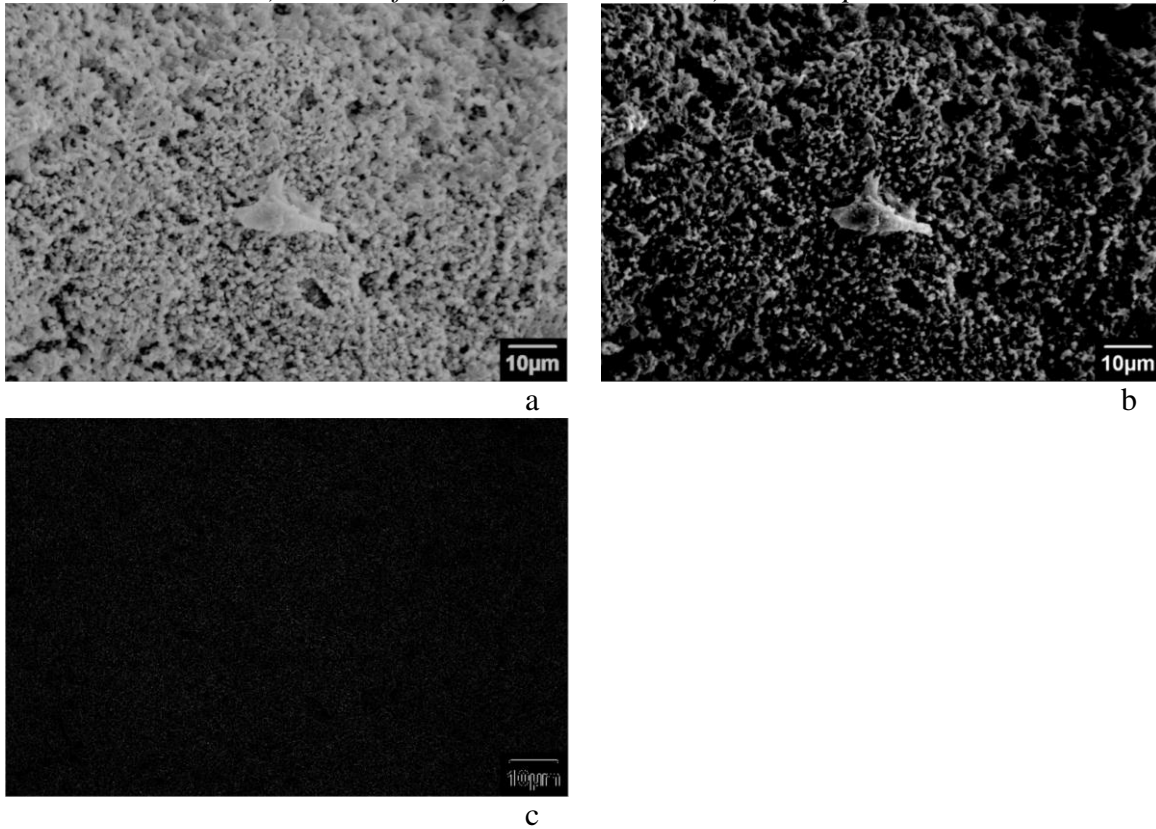
*Ilustración 56 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 1100x  
a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.*



*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

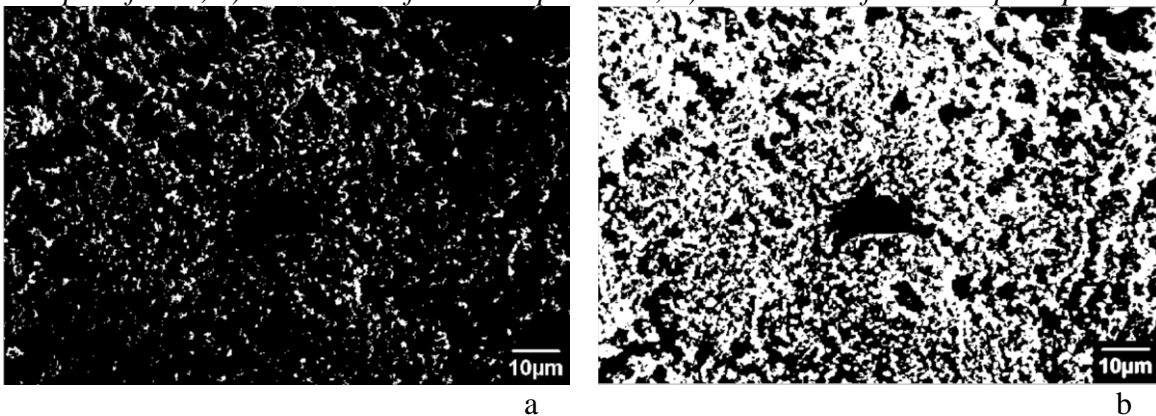


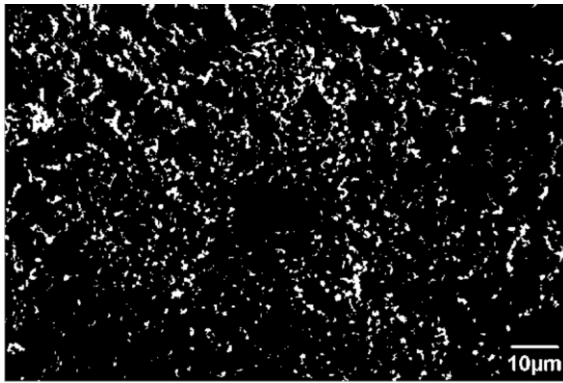
*Ilustración 57 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 1100x  
a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.*



*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

*Ilustración 58 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 1100x  
a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.*





c

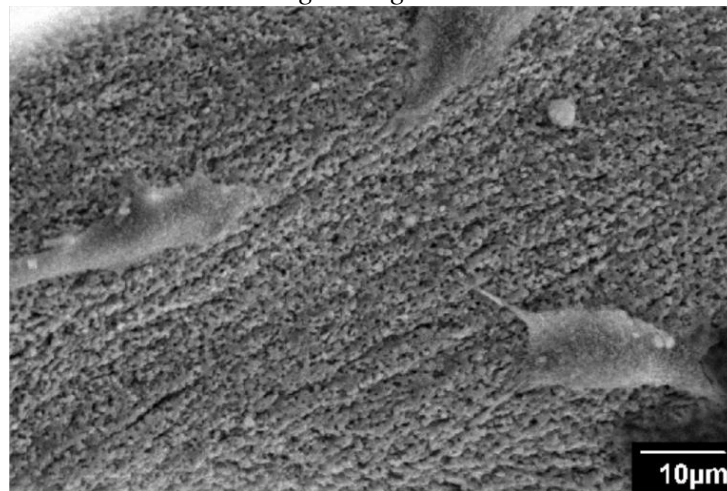


d

*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

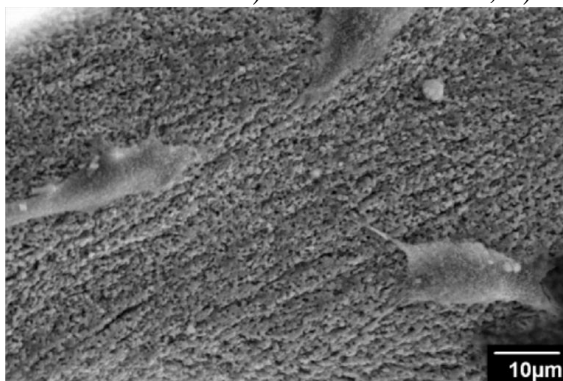
*Muestra Hidroxiapatita con osteoblastos muestra 1 con un zoom de 1550x*

*Ilustración 59 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 1500x imagen original.*

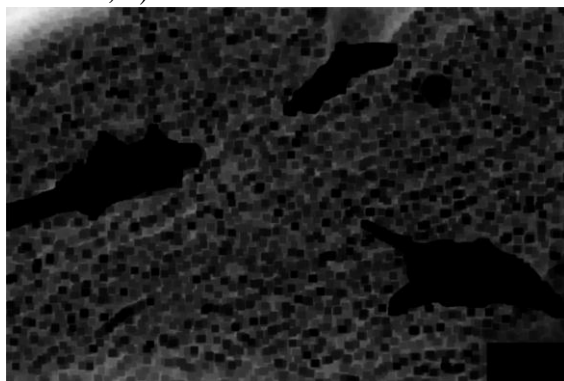


*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

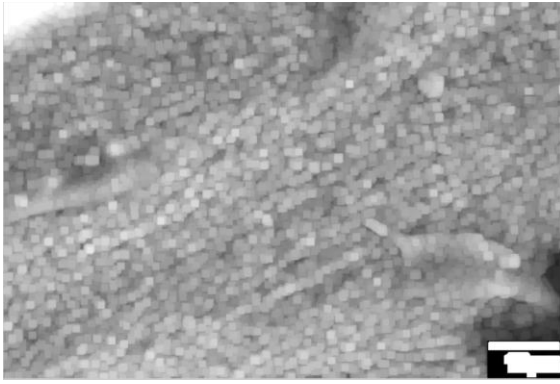
*Ilustración 60 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 1500x a) Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.*



a



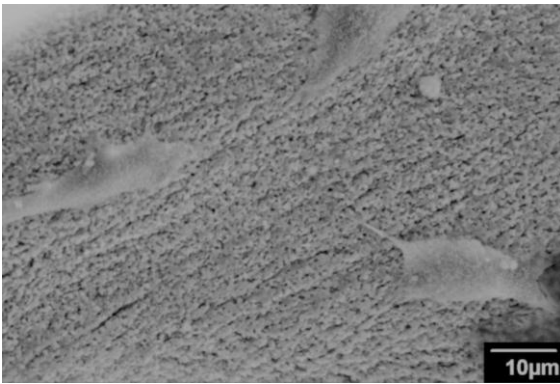
b



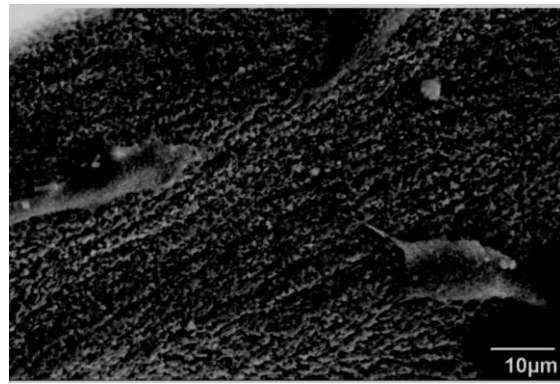
c

Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).

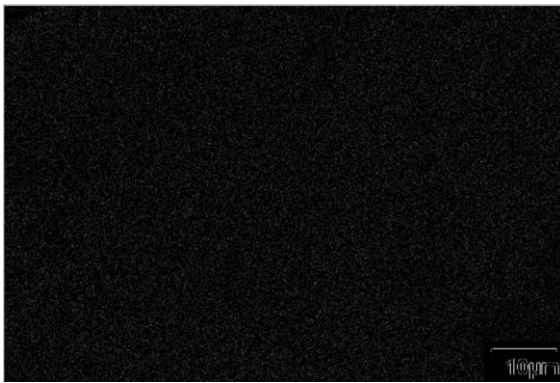
*Ilustración 61 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos. Zoom 1500x a) Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.*



a



b

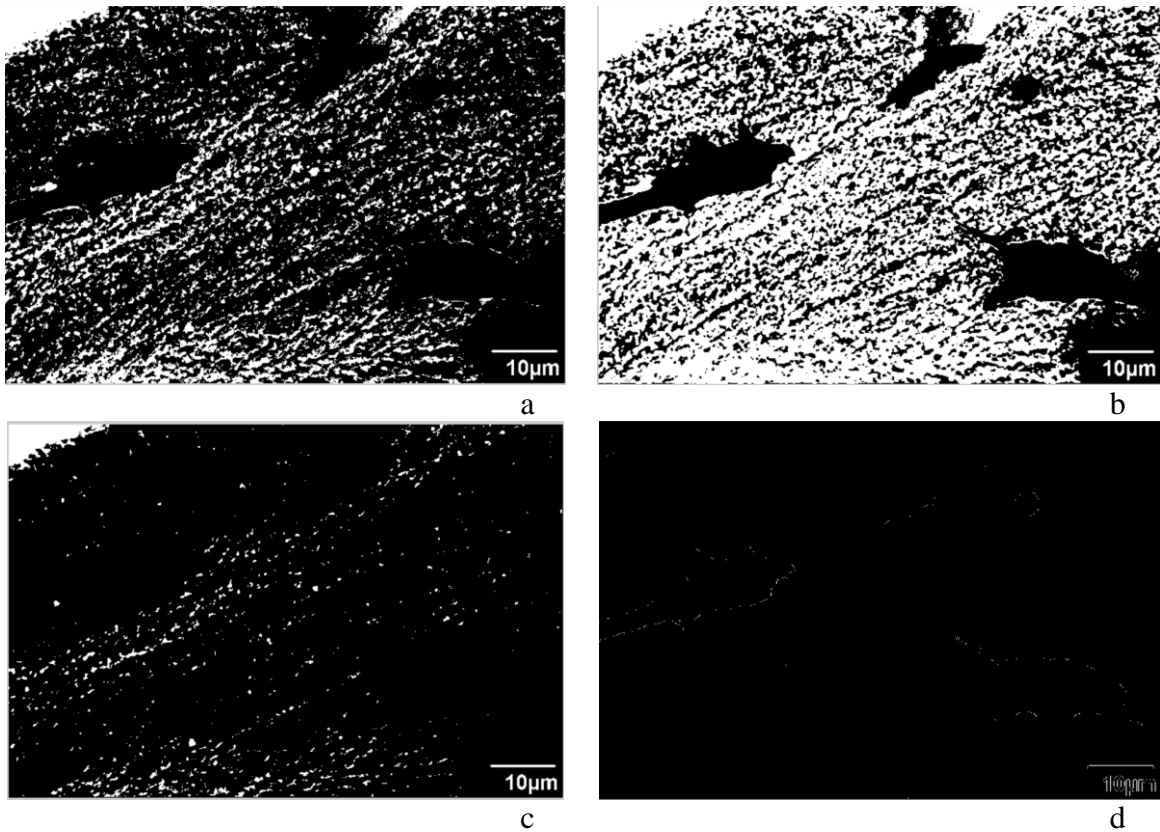


c

Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).

*Ilustración 62 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 1500x a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.*

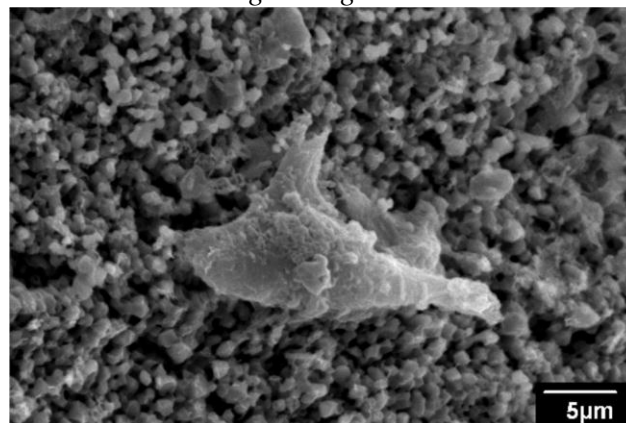




*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

*Muestra Hidroxiapatita con osteoblastos muestra 1 con un zoom de 3000x*

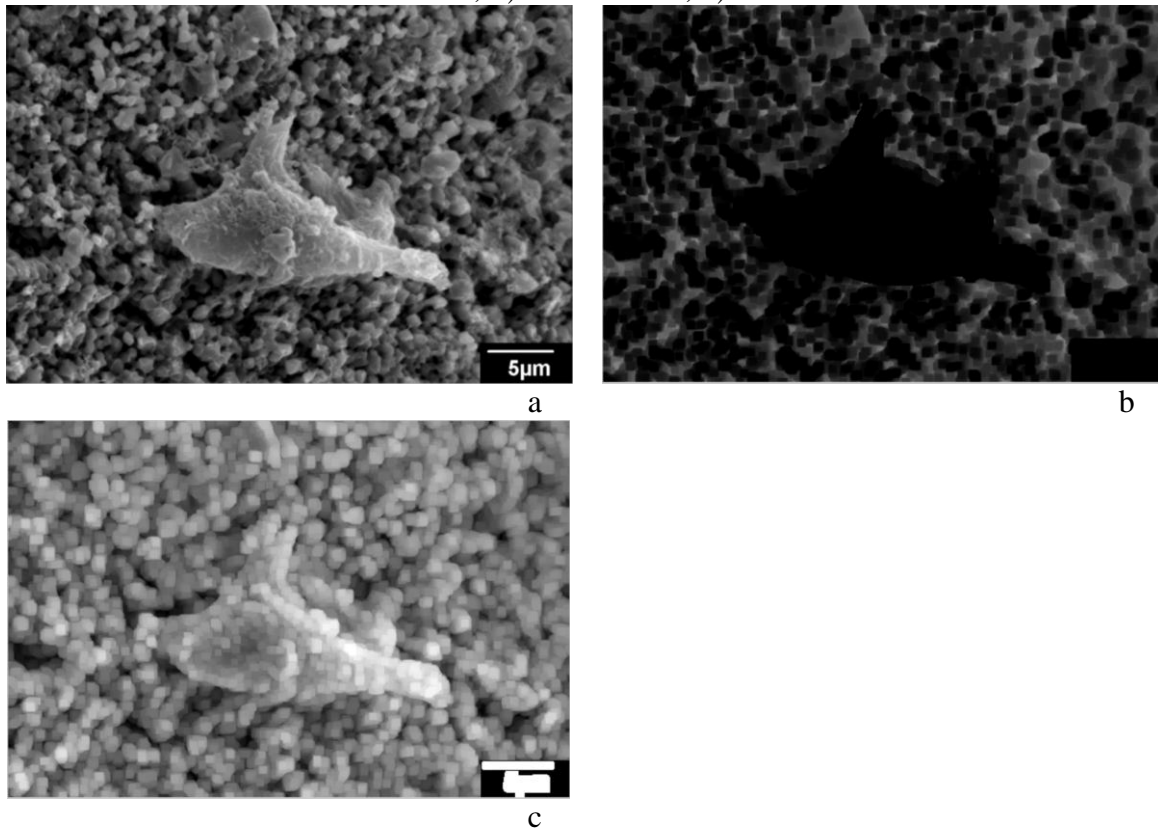
*Ilustración 63 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1, Zoom 3000x imagen original.*



*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

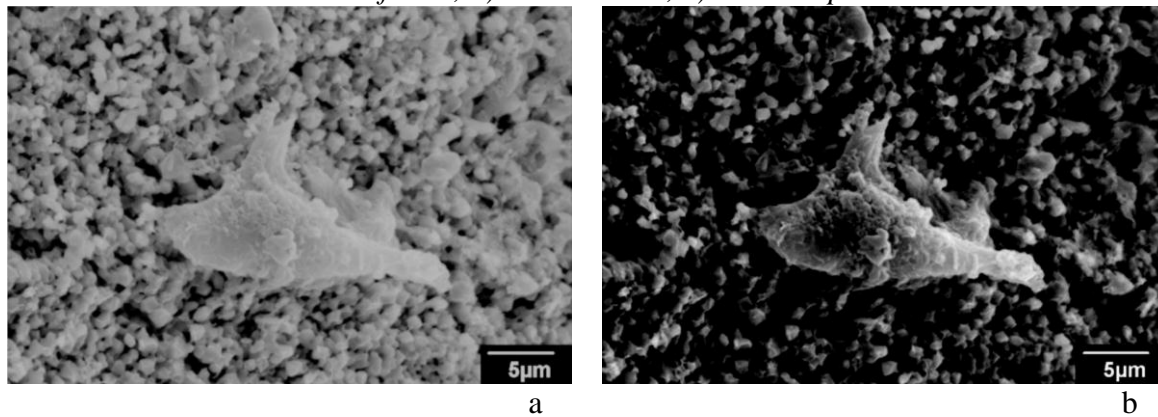


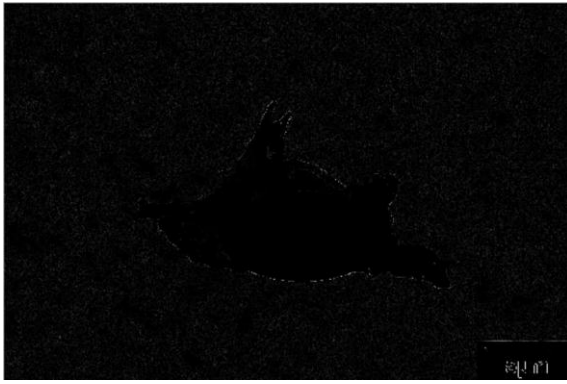
*Ilustración 64 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos muestra 1. Zoom 3000xa)  
Filtro Gaussiano, b) Filtro medio, c) Filtro dilatado.*



*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

*Ilustración 65 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblasto muestra 1. Zoom 3000x a)  
Plano inferior, b) Plano medio, c) Plano superior.*

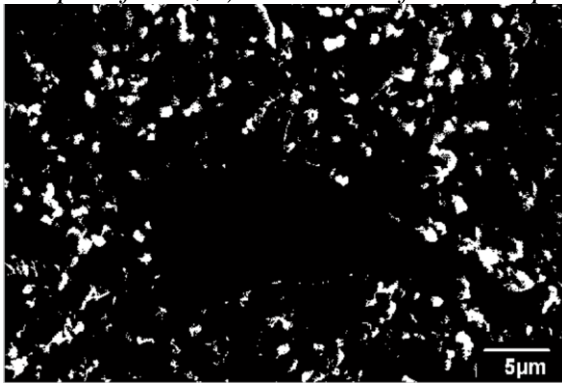




c

*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

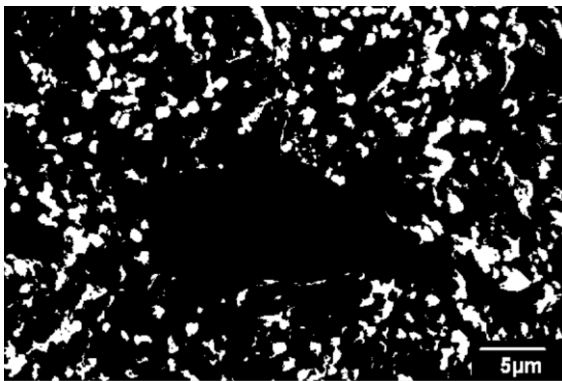
*Ilustración 66 Micrografía de Hidroxiapatita con Osteoblastos. Muestra 1. Zoom 3000x  
a) Original con los poros detectados mediante el algoritmo, b) Poros identificados en la capa inferior, c) Poros identificados capa media, d) Poros identificados capa superior.*



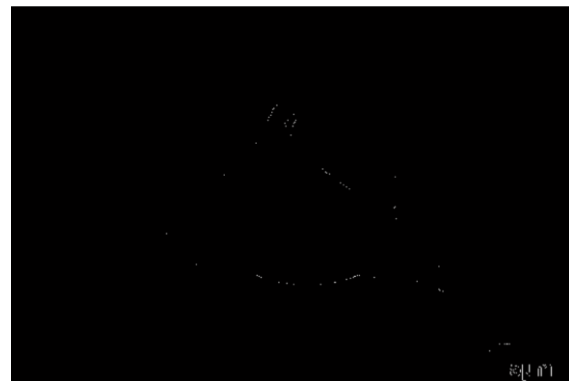
a



b



c



d

*Fuente. Tomado de (Sandra Perdomo, 2016).*

## 7 Resultados

### 7.1 Norma F1854-15

Dentro de la investigación de diferentes normas y entidades destacamos la ASTM F1854-15 debido a que esta especifica el método de medida de porosidad a escala más válido internacionalmente, mostrando características del proceso desarrollado y resultados (ASTM, 2015b).

#### *ASTM International*

Se describe la norma ASTM F1854-15 debido a que esta describe un método alternativo de cuantificación de la tasa de porosidad que se realiza a recubrimientos porosos empleados en implantes médicos (ASTM, 2015b).

#### *Designación: F1854 – 15*

Standard test Method for Stereologicla Evaluation of porous coatings on medical implants (*Método de prueba estándar para la evaluación estereológica de recubrimientos porosos en implantes médicos*)

Estereología: *La estereología es una ciencia que define el muestreo adecuado de secciones o proyecciones de un objeto para estimar parámetros geométricos del objeto* (Luis Alberto Fernández, 2014). Es decir, el objetivo de la estereología es la obtención de propiedades cuantitativas de objetos planos de materiales o tejidos tridimensionales a partir de secciones o proyecciones de los mismos. (González, 2009).

Este método de ensayo cubre los métodos de prueba estereológicos para la caracterización del espesor del recubrimiento, contenidos de vacíos y la longitud media de intercepción de diversos revestimientos porosos a sustratos no porosos.

#### *Glosario norma F1854-15*

**Campo (*Field*):** La imagen de una porción de la superficie de trabajo en donde las medidas son realizadas.

**Intercepción (*Intercept*):** Punto en una línea de la cuadrícula de medida proyectada en un campo donde la línea cruza de sólido a anular o viceversa.

**Interfaz de sustrato (*substrate interface*):** La región donde el revestimiento poroso está unido al sustrato.

Interfaz de tejido (*tissue interface*): La superficie del recubrimiento que deberá tener primero contacto con el tejido biológico (es decir, la parte superior de la revestimiento).

Líneas de cuadrícula de medición (*measurement grid lines*): Rejilla de medición cuadrícula uniformemente espaciadas de todas las líneas paralelas de la misma longitud.

Recubrimiento poroso (*porous coating*): El recubrimiento de un implante deliberadamente aplicado para contener regiones vacías con la intención de mejorar la fijación del implante.

Superficie de trabajo (*working surface*): El suelo y la cara pulida del montaje metalográfico donde las imágenes de los campos son capturadas.

Sustrato (*substrate*): El material sólido a la que el recubrimiento poroso se adjunta.

#### *Alcance norma F1854-15*

Los métodos presentados en la norma F1854 – 15 cubre métodos de pruebas estereológicas para caracterizar el espesor de recubrimiento, contenido de vacíos y la media de longitud de intercepción de diversos revestimientos porosos para adherirse a sustratos no porosos. Se describe detalladamente un método de medición del vacío del contenido a través del espesor del revestimiento poroso (ASTM, 2015b).

#### *Significado y uso norma F1854-15*

Todos los métodos citados en la norma son recomendados para la cuantificación de las propiedades morfológicas de los revestimientos porosos unidos a los sustratos sólidos. Igualmente los métodos descritos pueden ser útiles para la evaluación de diferentes revestimientos o porciones del mismo revestimiento. Se deben realizar sobre el mismo revestimiento (ASTM, 2015b).

Existen límites para la caracterización de la porosidad dependiendo de la longitud de separación entre las líneas de la misma rejilla (o puntos de la rejilla) y campos individuales o acumulados empleados para las mediciones. El aumento del tamaño de los campos, aumentará el número de campos y disminuyendo el espaciado de la cuadrícula aumentará la precisión de las mediciones adquiridas (ASTM, 2015b).

Los métodos descritos en la norma son adecuados para revestimientos cerámicos.

#### *Equipo norma F1854-15*

Los procedimientos descritos en el texto pueden ser realizados de manera manual o usando una técnica digital para análisis de imágenes. El microscopio u otro dispositivo adecuado que cuente con pantalla para visualización, con capacidad de fotomicrografía o captura digital de imágenes de deben utilizar para la captura de imágenes de los campos (ASTM, 2015b).

### *Superficies y campos de trabajo norma F1854-15*

Para las mediciones, la orientación de las muestras de trabajo y de la muestra debe ser lo más perpendicular posible al plano de muestra.

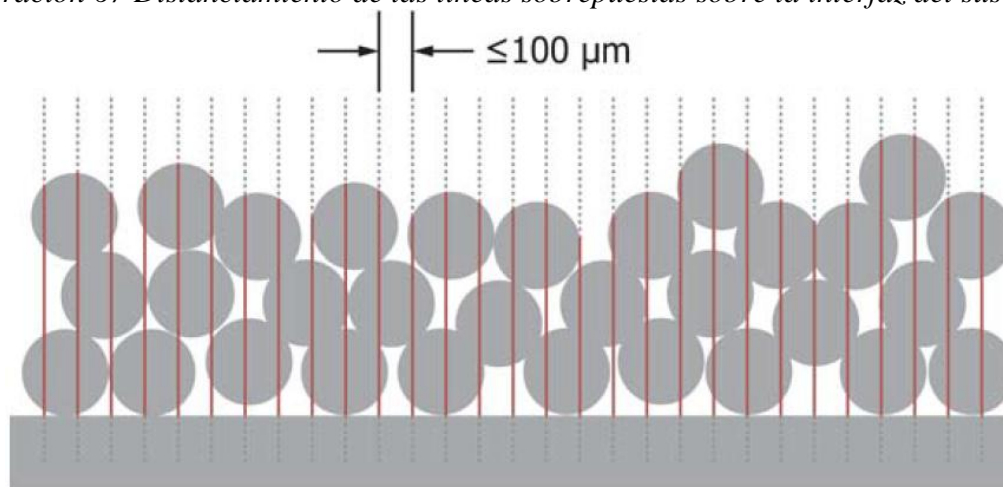
A medida que aumenta la ampliación, el número de campos deben aumentarse para obtener una muestra representativa. Si hay muy pocas intercepciones en los campos individuales, la precisión de la medición podría disminuir (ASTM, 2015b).

### *Resolución norma F1854-15*

El aumento empleado al momento de la toma de la muestra debe tener la ampliación suficiente para resolver todas las características del medio. Este tipo de aumento, en la mayoría de revestimientos porosos, debe contar con una ampliación tal que se puedan ver características tan pequeñas como de  $5\mu\text{m}$  para que estas puedan ser fácilmente descritas. Para imágenes digitales, el tamaño de los pixeles debe darse en micras ( $\mu\text{m}$ ) (ASTM, 2015b).

### *Procedimiento*

*Ilustración 67 Distanciamiento de las líneas sobrepuestas sobre la interfaz del sustrato.*



*Fuente. Tomado de (ASTM, 2015b).*

La superficie del sustrato es usualmente gruesa debido al procedimiento involucrado en la aplicación del recubrimiento. Si la superficie es demasiado áspera, una línea se realizará en cada campo indicando la interfaz promedio del sustrato. Las mediciones de espesores a continuación, se producirán a partir de esta línea. Las mediciones de espesor del recubrimiento deben obtenerse a una distancia lineal de al menos 20 mm de la superficie porosa con una superposición entre los sitios de medición. El promedio de todas las mediciones de espesor individuales de todos los campos es el espesor medio de recubrimiento. La medida estimada para la desviación estándar y el 95% del intervalo de

confianza debe ser calculada para todos los campos dados por las siguientes ecuaciones (ASTM, 2015b):

$$\bar{T} = \frac{1}{M \times n} \sum_{i=1}^n T_i \quad [24]$$

*Espesor medio de recubrimiento (ASTM, 2015b).*

Donde:

$t_i$  = es la longitud de la línea de espesor individuo ampliada

$n$  = número de mediciones de espesor

$M$  = la ampliación

$T$  = El espesor medio de recubrimiento.

$$CI = 2 * \frac{\hat{S}}{\sqrt{n}} \quad [25]$$

*Intervalo de confianza (ASTM, 2015b).*

Donde

$S$  = estimación de la desviación estándar

$CI$  = intervalo de confianza

Se obtiene una descripción del objeto desde la muestra. Las secciones metalográficas y la ubicación de las secciones dentro de ese objeto. Informe de la composición química del sustrato y los materiales de recubrimiento. La forma morfológica original del material de revestimiento (es decir, en polvo, alambre, y así sucesivamente) será informado. El número de campos de visión para cada medición, los aumentos utilizados, las redes y líneas utilizados serán reportados. La media del espesor del revestimiento, su desviación estándar, su intervalo de confianza, la interfaz del tejido, el porcentaje en volumen, su desviación nula estándar. Se informará la longitud media de intercepción vacío. Si la interfaz del sustrato está curvada en el plano de la superficie de trabajo, una estimación de la radio local de la curvatura será informada. Para las imágenes digitales, el valor mínimo de medición (es decir, la dimensión de un solo píxel) en todos los aumentos utilizados en las mediciones y las dimensiones de los píxeles (ASTM, 2015b).

## *7.2 Resultados obtenidos por el algoritmo*

A continuación se muestran los datos obtenidos por el algoritmo en los materiales, las primeras tres tablas se muestran los resultados obtenidos de cara uno de los materiales estudiados en este proyecto inicialmente se muestran los datos obtenidos con PLGA a un zoom de 20X en tres tipos diferentes posiciones de una misma muestra, al igual que en la matriz extracelular y en Hidroxiapatita con osteoblastos.

La Tabla 10 muestra los estudios de repetibilidad del proceso de medición porcentual del algoritmo la muestra utilizada para este proceso fue Matriz extracelular de cardo muestra 1 a 40X (1 40X ME) se utilizó este tipo de muestra porque sus características eran las más aptas para el desarrollo de este estudio; Los resultados obtenidos se detallaran en la sección de análisis de resultados y discusión.

Tabla 8 Tabla de resultados obtenidos de las imágenes de PLGA con la misma escala de zoom en diferentes puntos de la muestra.

Nombre de la muestras	1 20X PLGA	4 20X PLGA	5 20X PLGA
Pixel inicial de la escala	1165	1165	1165
Pixel final de la escala	1358	1358	1358
Valor de la línea blanca en escala únicamente numero	100	100	100
Largo de la imagen en pixeles	1388	1388	1388
Ancho de la imagen en pixeles	1040	1040	1040
Profundidad	100	100	100
Porcentaje de porosidad plano inferior (%)	44.8061	38.1376	38.4654
Porcentaje de porosidad plano medio (%)	10.5045	12.2773	15.1834
Porcentaje de porosidad plano superior (%)	0.0453	0.0456	0.0206
<b>Porcentaje de porosidad en la imagen (%)</b>	<b>18.4520</b>	<b>16.8202</b>	<b>17.8898</b>
<b>Valor de pixel por unidad de escala e incertidumbre(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><math>1.930 \pm 0.005</math></b>	<b><math>1.930 \pm 0.005</math></b>	<b><math>1.930 \pm 0.005</math></b>
Largo de la imagen e incertidumbre( $\mu\text{m}$ )	$719 \pm 2$	$719 \pm 2$	$719 \pm 2$
Ancho de la imagen e incertidumbre( $\mu\text{m}$ )	$538 \pm 1$	$538 \pm 1$	$538 \pm 1$
Profundidad de la imagen e incertidumbre( $\mu\text{m}$ )	$100.0 \pm 0.5$	$100.0 \pm 0.5$	$100.0 \pm 0.5$
Volumen de la muestra en la imagen e incertidumbre en ( $\mu\text{m}$ )	$3.87\text{e}+07 \pm 0.02\text{e}+07$	$3.87\text{e}+07 \pm 0.02\text{e}+07$	$3.87\text{e}+07 \pm 0.02\text{e}+07$
Largo de la imagen e incertidumbre (mm)	$0.719 \pm 0.002$	$0.719 \pm 0.002$	$0.719 \pm 0.002$
Ancho de la imagen e incertidumbre (mm)	$0.539 \pm 0.001$	$0.539 \pm 0.001$	$0.539 \pm 0.001$
Profundidad de la imagen e incertidumbre( $\text{mm}^3$ )	$0.100 \pm 0.001$	$0.100 \pm 0.001$	$0.100 \pm 0.001$
<b>Volumen de la muestra en la imagen e incertidumbre (<math>\text{mm}^3</math>)</b>	<b><math>0.0388 \pm 0.0006</math></b>	<b><math>0.0388 \pm 0.0006</math></b>	<b><math>0.0388 \pm 0.0006</math></b>
<b>Volumen libre de la muestras e incertidumbre (<math>\text{mm}^3</math>)</b>	<b><math>0.0072 \pm 0.0006</math></b>	<b><math>0.0065 \pm 0.0006</math></b>	<b><math>0.0069 \pm 0.0006</math></b>
<b>Promedio volumen libre de la muestras e incertidumbre (<math>\text{mm}^3</math>)</b>	<b><math>0.0069 \pm 0.0001</math></b>		



Tabla 9 Tabla de resultados obtenidos de las imágenes de matriz extracelular de cerdo misma escala de zoom en diferentes puntos de la muestra

Nombre de la muestras	1 40X ME	2 40X ME	3 40X ME
Pixel inicial de la escala	782	782	795
Pixel final de la escala	819	819	832
Valor de la línea blanca en escala únicamente numero	10	10	10
Largo de la imagen en pixeles	868	868	868
Ancho de la imagen en pixeles	596	596	596
Profundidad	100	100	100
Porcentaje de porosidad plano inferior (%)	36.9224	36.9093	37.8957
Porcentaje de porosidad plano medio (%)	7.3895	7.5969	7.4586
Porcentaje de porosidad plano superior (%)	0.0702	0.0675	0.0547
<b>Porcentaje de porosidad en la imagen (%)</b>	<b>14.7940</b>	<b>14.8579</b>	<b>15.1359</b>
<b>Valor de pixel por unidad de escala e incertidumbre (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>3.70 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>3.70 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>3.70 <math>\pm</math> 0.05</b>
Largo de la imagen e incertidumbre ( $\mu\text{m}$ )	235 $\pm$ 3	235 $\pm$ 3	235 $\pm$ 3
Ancho de la imagen e incertidumbre ( $\mu\text{m}$ )	161 $\pm$ 2	161 $\pm$ 2	161 $\pm$ 2
Profundidad de la imagen e incertidumbre ( $\mu\text{m}$ )	100.0 $\pm$ 0.5	100.0 $\pm$ 0.5	100.0 $\pm$ 0.5
Volumen de la muestra en la imagen e incertidumbre en ( $\mu\text{m}$ )	3.78e+06 $\pm$ 0.07e+06	3.78e+06 $\pm$ 0.07e+06	3.78e+06 $\pm$ 0.07e+06
Largo de la imagen e incertidumbre (mm)	0.235 $\pm$ 0.003	0.235 $\pm$ 0.003	0.235 $\pm$ 0.003
Ancho de la imagen e incertidumbre (mm)	0.161 $\pm$ 0.002	0.161 $\pm$ 0.002	0.161 $\pm$ 0.002
Profundidad de la imagen e incertidumbre(mm <sup>3</sup> )	0.100 $\pm$ 0.002	0.100 $\pm$ 0.002	0.100 $\pm$ 0.002
<b>Volumen de la muestra en la imagen e incertidumbre (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>0.0038 <math>\pm</math> 0.0001</b>	<b>0.0038 <math>\pm</math> 0.0001</b>	<b>0.0038 <math>\pm</math> 0.0001</b>
<b>Volumen libre de la muestras e incertidumbre (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>5.6e-04 <math>\pm</math> 0.2e-04</b>	<b>5.6e-04 <math>\pm</math> 0.2e-04</b>	<b>5.6e-04 <math>\pm</math> 0.2e-04</b>
<b>Promedio volumen libre de la muestras e incertidumbre (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>5.6e-04 <math>\pm</math> 0.2e-04</b>		

*Tabla 10 Tabla de resultados obtenidos de las imágenes de Hidroxiapatita (HAp) con osteoblastos misma escala de zoom en diferentes puntos de la muestra.*

Nombre de la muestras	1100x HAp	1550x HAp	3000x HAp
Pixel inicial de la escala	1151	1117	1092
Pixel final de la escala	1256	1262	1237
Valor de la línea blanca en escala únicamente numero	10	10	5
Largo de la imagen en pixeles	1280	1280	1280
Ancho de la imagen en pixeles	860	860	860
Profundidad	100	100	100
Porcentaje de porosidad plano inferior (%)	50.6050	53.9457	50.3540
Porcentaje de porosidad plano medio (%)	7.8808	3.2698	15.0386
Porcentaje de porosidad plano superior (%)	0.0918	0.1420	0.1001
<b>Porcentaje de porosidad en la imagen (%)</b>	<b>19.5259</b>	<b>19.1192</b>	<b>21.8309</b>
<b>Valor de pixel por unidad de escala e incertidumbre(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><math>10.50 \pm 0.05</math></b>	<b><math>14.50 \pm 0.05</math></b>	<b><math>29.0 \pm 0.1</math></b>
Largo de la imagen e incertidumbre( $\mu\text{m}$ )	$121.9 \pm 0.6$	$88.3 \pm 0.3$	$44.1 \pm 0.2$
Ancho de la imagen e incertidumbre( $\mu\text{m}$ )	$81.9 \pm 0.4$	$59.3 \pm 0.2$	$29.6 \pm 0.1$
Profundidad de la imagen e incertidumbre( $\mu\text{m}$ )	$100.0 \pm 0.5$	$100.0 \pm 0.5$	$100.0 \pm 0.5$
Volumen de la muestra en la imagen e incertidumbre ( $\mu\text{m}$ )	$9.98 \text{ e}+05 \pm 0.08 \text{ e}+05$	$5.24 \text{ e}+05 \pm 0.04 \text{ e}+05$	$1.309 \text{ e}+05 \pm 0.009 \text{ e}+05$
Largo de la imagen e incertidumbre (mm)	$0.1219 \pm 0.0006$	$0.0883 \pm 0.0003$	$0.0441 \pm 0.0002$
Ancho de la imagen e incertidumbre (mm)	$0.0819 \pm 0.0004$	$0.0593 \pm 0.0002$	$0.0297 \pm 0.0001$
Profundidad de la imagen e incertidumbre( $\text{mm}^3$ )	$0.1000 \pm 0.0004$	$0.1000 \pm 0.0002$	$0.1000 \pm 0.0001$
<b>Volumen de la muestra en la imagen e incertidumbre (<math>\text{mm}^3</math>)</b>	<b><math>0.998 \text{ e}-03 \pm 0.008 \text{ e}-03</math></b>	<b><math>0.524 \text{ e}-03 \pm 0.003 \text{ e}-03</math></b>	<b><math>0.1309 \text{ e}-03 \pm 0.0007 \text{ e}-03</math></b>
<b>Volumen libre de la muestras e incertidumbre (<math>\text{mm}^3</math>)</b>	<b><math>1.95 \text{ e}-04 \pm 0.01 \text{ e}-04</math></b>	<b><math>1.001 \text{ e}-04 \pm 0.005 \text{ e}-04</math></b>	<b><math>2.86 \text{ e}-05 \pm 0.01 \text{ e}-05</math></b>
<b>Promedio volumen libre de la muestras e incertidumbre (<math>\text{mm}^3</math>)</b>	<b><math>1.080 \text{ e}-04 \pm 0.857 \text{ e}-06</math></b>		

*Tabla 11 Tabla de resultados obtenidos de la misma muestra de matriz extracelular de cerdo por medio de 5 repeticiones de algoritmo desarrollado en Matlab.*

Nombre de la muestra	1 40X				
Repetición	1	2	3	4	5
Pixel inicial de la escala	782				
Pixel final de la escala	819				
Valor de la línea blanca en ( $\mu\text{m}$ )	10				
Largo de la imagen en pixeles	868				
Ancho de la imagen en pixeles	596				
Profundidad	100				
Porcentaje de porosidad plano inferior (%)	36.9224	36.9224	36.9224	36.9224	36.9224
Porcentaje de porosidad plano medio (%)	7.3895	7.3895	7.3895	7.3895	7.3895
Porcentaje de porosidad plano superior (%)	0.0702	0.0702	0.0702	0.0702	0.0702
<b>Porcentaje de porosidad en la imagen (%)</b>	<b>14.7940</b>	<b>14.7940</b>	<b>14.7940</b>	<b>14.7940</b>	<b>14.7940</b>
<b>Valor de pixel por unidad de escala e incertidumbre (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><math>3.70 \pm 0.05</math></b>	<b><math>3.70 \pm 0.05</math></b>	<b><math>3.70 \pm 0.05</math></b>	<b><math>3.70 \pm 0.05</math></b>	<b><math>3.70 \pm 0.05</math></b>
<b>Volumen de la muestra en la imagen e incertidumbre (<math>\text{mm}^3</math>)</b>	<b><math>3.8\text{e-}3 \pm 0.1\text{e-}3</math></b>	<b><math>3.\text{e-}38 \pm 0.1\text{e-}3</math></b>	<b><math>3.8\text{e-}3 \pm 0.1\text{e-}3</math></b>	<b><math>3.\text{e-}38 \pm 0.1\text{e-}3</math></b>	<b><math>3.8\text{e-}3 \pm 0.1\text{e-}3</math></b>
<b>Volumen libre de la muestras e incertidumbre (<math>\text{mm}^3</math>)</b>	<b><math>5.6\text{e-}04 \pm 0.2\text{e-}04</math></b>	<b><math>5.6\text{e-}04 \pm 0.2\text{e-}04</math></b>	<b><math>5.6\text{e-}04 \pm 0.2\text{e-}04</math></b>	<b><math>5.6\text{e-}04 \pm 0.2\text{e-}04</math></b>	<b><math>5.6\text{e-}04 \pm 0.2\text{e-}04</math></b>

### 7.3 Análisis de Resultados

En el momento de realizarse el algoritmo se tomaron en cuenta las pautas de los diagramas que se muestran en las *Ilustración 25* e *Ilustración 26*, en el cual se especifican las diferentes funciones que se desean tener del algoritmo en esta se establecen los rangos deseados, tipos de entradas necesarios para el algoritmo y tipos de salidas que deseamos tener en el momento de analizar la imagen de la muestras.

Los requerimientos mencionados se tuvieron en cuenta para el desarrollo del algoritmo y en cuanto al microscopio utilizado para la toma de imágenes de las muestras se utilizó un microscopio ZEISS Image.A2 a escalas de acercamiento de 20X en PLGA y 40X Matriz extracelular de cerdo, con este equipo se tomaron alrededor de unas 10 imágenes de los materiales mencionados anteriormente con el fin de tener características variadas de los materiales y tener en cuenta las mejores muestras para su muestra por medio de este documento.

En el momento de desarrollar el algoritmo se buscó solucionar el ruido generado por el desenfoque al momento de la imagen. El empleo caracterización porcentual de porosidad por medio de capas nos brindó una mejor caracterización de la imagen debido a que en esa se descompuso cada imagen logrando así un mejor diagnóstico, facilitando el cálculo para que este no se viera afectado.

Para la implementación del algoritmo fue necesario tener en cuenta parte de su funcionamiento los cálculos necesarios para hallar el volumen de la muestra la conversión de unidades y sus diferentes incertidumbres cómo se logra ver desde la *Ecuación 12* hasta la *Ecuación 22*, con base en estos cálculos fue posible hallar incertidumbre de la conversión de pixeles a micrómetros, como también el volumen libre de la muestra y el volumen total de esta.

La *ilustración 30*, en el diagrama establecen las pautas que tendrá el algoritmo basados en los *diagramas de las ilustraciones 25 y 26*, en este diagrama #B se especifica cada acción deseada y cada una de sus etapas se denomina con letras las cuales van de la (A-H), siendo (A) la carga de la imagen y su extensión en el algoritmo y (H) solo la visualización de las imágenes obtenidas después del tratamiento, en la letra (G) se obtienen todos los resultados deseados sobre las imágenes estudiadas los cuales se muestran en las *Tablas 8, 9 y 10*, tablas mencionadas más adelante.

En la secciones de letras del algoritmo se explica cómo cada una de las funciones desarrolladas por el algoritmo ayuda en el procesamiento de la imagen y de esta manera conseguir el resultado esperado, el cual era la porosidad porcentual presente en la muestra.

El algoritmo realizado en este proyecto permite evaluar la porosidad de biomateriales en presencia de material biológico, como también sin presencia de éste. Al analizar una imagen, el programa puede brindar información sobre: porcentaje de porosidad en el plano inferior, porcentaje de porosidad plano medio, porcentaje de porosidad plano superior, porcentaje por capa, porcentaje total de porosidad en la imagen, valor de pixel por unidad

de escala e incertidumbre( $\mu\text{m}$ ), largo de la imagen e incertidumbre( $\mu\text{m}$ ), ancho de la imagen e incertidumbre( $\mu\text{m}$ ), profundidad de la imagen e incertidumbre( $\mu\text{m}$ ), volumen de la muestra en la imagen e incertidumbre en ( $\mu\text{m}$ ), largo de la imagen e incertidumbre (mm), ancho de la imagen e incertidumbre (mm), profundidad de la imagen e incertidumbre(mm), volumen de la muestra en la imagen e incertidumbre ( $\text{mm}^3$ ), volumen libre de la muestras e incertidumbre ( $\text{mm}^3$ ). De esta manera, en la parte superior de la tabla se describe el nombre de la muestra, el pixel inicial de la escala, el pixel final de la escala, el valor de la línea blanca en la escala, el largo de la imagen en pixeles, ancho de la imagen en pixeles y la profundidad de la imagen; estos últimos valores son introducidos por el usuario al algoritmo.

Al obtener las imágenes de cada uno de los materiales fue necesario clasificar que información era relevante en estas imágenes para observar el proceso de cuantificación de porosidad, se estableció que los planos RGB no eran de gran interés en el desarrollo de estos estudios debido a que las imágenes que se estaban trabajando obtenidas del microscopio se encontraban a escala de grises, siendo el método RGB usado para imágenes a color en donde se dividen los planos y cada plano es convertido a una escala de grises, sin embargo se mantuvo dentro del algoritmo para demostrar que el estudio de la porosidad por medio de este algoritmo no solo se limita a imágenes en escala de grises si no que de igual manera es posible utilizar imágenes a color para el estudio y cuantificación porcentual de la porosidad, reconociendo esto se procede a mostrar las diferentes etapas del algoritmo en el tratamiento de la imagen como se observa en la *Ilustración 32* la cual muestra la segmentación por capas por medio de Gauss, filtro de valor medio y filtro por dilatado, como se expresa en la parte (C) del código en donde la imagen a tratar segmenta sus pixeles por medio de Gauss como se muestra en la *Ecuación 22*, de esta manera obteniendo una mejor resolución en pixel logrando observar de una mejor manera características finas de la imagen y teniendo en cuenta en esta etapa únicamente la parte inferior del materia los detalles más lejanos de la imagen y de más difícil detección, seguido de esto se utiliza el método filtro promedio o “average” el cual define un valor medio de colores de pixeles y por medio de esta calcula la porosidad en el plano medio de la imagen, por último se utiliza el funcionamiento de filtrado por dilatado en el cual se usan las funciones “imdilate y imerode” en donde la imagen se ve afectada por la expansión de sus pixeles y se observa de manera desenfocada este tratamiento se hace con el fin de reconocer porosidades que se encuentran en la parte superior o más cercana al lente; de esta manera se obtiene la caracterización de cada uno de los planos y se procede a dar un valor aproximado de porosidad en un valor porcentual según la información de cada plano y un valor porcentual total sacado de la media de los tres valores calculados.

En la *Ilustración 33* se realiza el contraste de los tres planos logrando medir de una manera más fácil las características de porosidad en cada uno de los planos, en la *Ilustración 34* se observa la última etapa de tratamiento de la imagen donde se binariza la imagen y sus valores de pixel pasan de ser [0 a 255] a ser [0 a 1] siendo el valor 0 los negros en la imagen y el valor 1 los blancos en la imagen.

Durante el estudio de la matriz extracelular de cerdo se logró establecer una mejor medición de porosidad debido a las características morfológicas de la superficie del material, las cuales no presentan irregularidades tan marcadas como la del PLGA, en el cual

se detalla en las imágenes una variación de los valores, esto se debe a que el material posee una superficie no uniforme lo que causa una distribución irregular provocando desniveles que afectaron la toma de la imagen en el microscopio. Este factor genera un aumento de la incertidumbre de las medidas. Este proceso se repite en las diferentes imágenes de PLGA utilizadas y en la matriz extracelular.

En el momento de realizar la cuantificación de porosidad sobre Hidroxiapatita con osteoblastos fue necesario realizar una pequeña variación al algoritmo esta variación se dio debido a que las imágenes obtenidas de Hidroxiapatita con medio *in vitro* de osteoblastos fueron sacadas por medio de microscopia electrónica de barrido, esta variación se da debido a que se identifica que los puntos claros en las muestras de microscopia electrónica de barrido son debido a la presencia de material y no a la falta de éste, debido a esto es necesario cambiar las características de identificación buscando obtener los resultados deseados, logrando de esta manera descartar de manera exitosa en la filtración del osteoblasto colocándolo entre los datos no deseados, midiendo de forma adecuada la porosidad presente en la imagen.

En la caracterización de imágenes se logra observar que los planos superiores registran cantidades menores de porosidad, debido a que se emplea el porcentaje de porosidad promedio entre las capas con el objetivo de disminuir el margen de error que presenta la medida de los planos superior e inferior. Este último realiza un aproximado de píxeles adyacentes identificando los valores de cada uno.

Entre los resultados obtenidos se resalta la elección de la norma ASTM F1854-15, esta norma nos enseña las características que se deben tener en cuenta en el momento de medir porosidad y como por medio de este método es posible expresar un valor de porosidad sea numeral o aproximado y que margen de error es posible manejar en este tipo de cálculos, con base a esta norma se busca aplicar el método r&R de repetibilidad y reproducibilidad del método desarrollado este método se muestra en las *Tablas 8, 9 y 11* de los resultados obtenidos.

En el momento de cuantificar la porosidad en el PLGA fue posible creer que una de las mayores causas de variación de los resultados obtenidos en la cantidad porcentual de porosidad presente en la muestra se debe a irregularidades de su superficie, debido a que esta no contaba con una superficie uniforme lo cual causa variaciones de concentración en la muestra ya sean de mayor cantidad de material o un mayor grosor de la muestra en puntos aleatorios, de la matriz de PLGA, por ello no fue posible conseguir una mejor precisión en los resultados obtenidos en el momento de procesar la imagen de la muestra.

Como se puede observar en la *Tabla 8*, en la parte superior se encuentran los datos introducidos por el usuario, estos valores son iguales para las tres imágenes en estudio ya que hacen parte de una misma muestra, con una misma resolución, únicamente difieren en la zona en que fue tomada la imagen de la misma muestra. En la parte inferior se observan los valores que se obtienen del algoritmo nombrados anteriormente, los resultados del porcentaje de porosidad en cada uno de los planos tienen una variación mínima; El porcentaje de porosidad en la imagen muestra una similitud en los valores debido a que

muy cercanos entre sí con una variación máxima de las primeras muestras de 1,6318% entre un valor y otro.

Más adelante, se puede observar el volumen de la muestra en la imagen con su incertidumbre, calculados con el largo, ancho y profundidad de la misma, expresada en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ). Igualmente se muestra el volumen de la muestra en la imagen y su respectiva incertidumbre expresadas en  $\text{mm}^3$ . Finalmente se muestra el volumen libre de la muestra y su incertidumbre expresado en  $\text{mm}^3$ . Este valor nos indica el volumen de porosidad en la superficie y en la parte interna del material, el valor de incertidumbre indica una buena exactitud podríamos manejar con respecto al valor real de los datos colocados y el valor obtenido por nosotros siendo su porcentaje de porosidad libre un rango entre 0,0071 y 0,0065 con una incertidumbre del 0,0006; encontrándonos dentro de la escala de error permitida estimando que los valores obtenidos son un buen aproximado al volumen libre en la muestra.

En la *Tabla 9* se encuentran los resultados obtenidos del estudio realizado a las imágenes de la matriz extracelular de cerdo en los diferentes puntos de la muestra, así como el acercamiento en la toma de cada uno. Al igual que en la tabla anterior, en la parte superior se muestran los valores de pixel, largo, ancho y profundidad de la imagen. En la segunda sección, se observan los resultados brindados por el algoritmo. Se puede observar que los valores de porosidad que se presenta por capa es muy cercana presentándose una variación del 0,3419% entre los valores medidos de porosidad porcentual en las muestras son muy cercanos, lo que indica una homogeneidad en la porosidad de la muestra y la reproducibilidad del algoritmo en esta muestra como también en las muestras estudiadas de PLGA debido a que son tres diferentes cuadrantes de la muestra y su variación en el cálculo no es mayor a un 2% en ninguno de los dos casos y sus variaciones en incertidumbre del valor en las seis muestras se encuentran dentro del rango y en el caso de la medida en la matriz extracelular el volumen de porosidad libres es el mismo en las tres muestras, lo cual nos muestra una homogeneidad de porosidad en toda la muestra estudiada.

En la *Tabla 10* se muestran los resultados obtenidos de las imágenes de Hidroxiapatita con osteoblastos a diferentes escalas de medida en la misma muestra. Se evidencia que el porcentaje de porosidad en la imagen varía en un 2,310%, valores muy cercanos y que dan a entender una homogeneidad en el material observado aunque este se encuentre a diferentes escalas de acercamiento. El valor de pixel por unidad de escala muestra una similitud en las imágenes con un zoom 1100x y 1550x, sin embargo en la imagen 3000x el valor aumenta 10 veces su tamaño, es posible observar que en la primera columna con un acercamiento o zoom de 1100x el porcentaje de porosidad es del 19,5259% y un volumen libre de  $0,195\text{e-}03 \pm 0,008\text{e-}03$ , en la segunda columna a un zoom de 1550x se observa que la porosidad porcentual es de 19,1192% pero su volumen libre es menor al presente en la primera columna, el valor en volumen libre es de  $0,100\text{e-}03 \pm 0,003\text{e-}03$  esto puede deberse a que el acercamiento que se hace puede limitar el área de medida a una menor y aumentar el tamaño del osteoblasto presente en la muestra causando esta variación tan grande entre estos dos tipos de acercamiento, en la tercera columna de este cuadro se utiliza un zoom de 3000x y su porcentaje de porosidad en comparación al valor de 1100x varía únicamente 2,310% lo que es necesario tener en cuenta en esta imagen es el valor porcentual de porosidad pues este en vez de disminuir como lo hizo en el zoom 1550X con

respecto al de 1100x este aumenta si porcentaje de porosidad es del 21,8309% con un volumen libre de  $0.2857\text{e-}4 \pm 0.0066\text{e-}04$  el aumento en el volumen y en la porosidad puede deberse a que en esta escala de acercamiento no solo se tienen en cuenta poros en micrómetros sino que debe ser posible identificar nano porosidades presentes en la muestra las cuales no se tuvieron en cuenta en los otros acercamientos.

En la *Tabla 11* se presentan los datos de repetibilidad basados en la muestra 1 de matriz extracelular a un zoom de 40x, se utiliza esta imagen debido que los resultados obtenidos en matriz extracelular fueron iguales se realizan cinco repeticiones en el algoritmo buscando una variación de sus valores medidos pero como se puede observar todos los resultados obtenidos en la tabla son iguales en todas sus repeticiones, en base a estos resultados es posible deducir que la repetibilidad del método es muy buena al no presentar ninguna variación en el momento de calcular la porosidad porcentual, el volumen libre o el volumen total de la muestra.

## 8 Discusión

De acuerdo con los resultados de las tablas 8, 9 y 11, los materiales muestran una porosidad similar en los diferentes puntos de toma de las muestras basados en los datos obtenidos. La porosidad de acuerdo al porcentaje calculado en la matriz de Hidroxiapatita con osteoblastos es la más alta, seguida que la de PLGA y finalmente la muestra de la matriz extracelular de cerdo con el porcentaje más bajo. Según los valores de volumen libre de las muestras, la muestra de Hidroxiapatita con osteoblastos se registró como la menor, sin embargo, este resultado se puede ver afectado en gran medida por la presencia de los diferentes acercamientos utilizados o por el método en el cual se desarrolló la toma de la muestra.

El algoritmo se diseñó con el fin de realizar un estudio en imágenes obtenidas por medio de microscopia óptica, tal y como fue planteado en un principio. Sin embargo, se presentaron problemas con la preparación del material de PLGA con material biológico, esto debido a que se enviaron las muestras para ser tratadas por medio de un método de inmersión en parafina, esto con el fin de obtener el grosor de  $5\mu\text{m}$  a  $10\mu\text{m}$  deseado para la muestra y así apreciar sus características fácilmente, esto no fue posible debido a que se esperaba que el corte de las muestras enviadas al laboratorio se realizara de modo horizontal dejándolas con un espesor de menos de  $30\mu\text{m}$  y al momento de recibir las muestras se observó que los cortes se habían realizado en forma vertical, por lo que no fue posible utilizarlas en este estudio.

A su vez, el grupo de investigación UIBO de la Universidad El Bosque, proporciono unas imágenes de Hidroxiapatita con osteoblastos desarrolladas por microscopia electrónica de barrido, con estas imágenes se lograron realizar las pruebas del algoritmo desarrollado en un medio *in vitro*, de los cuales son los resultados presentados en la *Tabla 10* en este documento.



De haber sido posible el uso de imágenes obtenidas mediante una microscopia ópticas del medio *in vitro* se podrían tener mejores características en el conteo de porosidad, debido a que el método de microscopía funciona por la incidencia de una haz de luz que traspasa la muestra, por medio de este haz es posible ver donde se encuentran los poros debido a que estas partes se aclaran y permiten una mejor observación, haciendo su identificación más sencilla, a diferencia del método SEM que funciona por la difracción de un rayo donde este ‘grafica’ o dibuja según la cantidad de luz difractada sobre la muestra dando así las características de la superficie de esta por medio de una imagen, lo cual afecta el cálculo del algoritmo ya que este está diseñado para avaluar los puntos claros, a diferencia del método SEM, en el cual las partes claras de la muestra es donde se encuentra el material, por esto fue necesario que el algoritmo leyera un rango diferente para poder dar un porcentaje de porosidad aproximado en este tipo de imágenes.

El método de repetibilidad y reproducibilidad (r&R) se realizó con la cantidad de muestras disponibles aunque no se lograron hacer las repeticiones o tomar las muestras suficientes para un estudio de reproducibilidad completo, se buscó por medio de los datos obtenidos sacar unas aproximaciones cómo fue posible observar en las *Tablas 8 y 9* del escrito las 6 muestras tomadas muestran una variación mínima para el estudio de porosidad porcentual volumen libre y volumen total de la muestra para estos dos materiales lo cual nos da un comportamiento de reproducibilidad adecuado para las muestras por esta mínima variación y en cuanto al método de repetibilidad desarrollado se dieron 5 estudios repetidos de porosidad volumen libre y volumen total de la misma imagen de matriz extracelular de cerdo buscando variaciones en los cálculos en alguna de estas repeticiones pero cómo se logra observar en la *Tabla 11* y se menciona en el análisis de resultados estos valores no demostraron ninguna variación lo cual nos puede demostrar la repetibilidad del método sobre la imagen de la muestra a estudio; es necesario tener en cuenta que el método no se logró profundizar debido a los inconvenientes tenidos con las muestras, pero aun así se lograron evaluar todos los objetivos estipulados para este proyecto, de esta forma logrando evaluar todas las características que se estipularon en diagrama de requerimientos para el algoritmo desarrollado, siendo este producto final de este proyecto.

## 9 Conclusiones

- La medición de porosidad en la muestra de Hidroxiapatita con osteoblastos se desarrolló de la manera deseada logrando medir porosidad en biomateriales en un estudio *in vitro*.
- No se realizó de manera adecuada el método r&R de las muestras de Hidroxiapatita con osteoblastos en estudio *in vitro*, sin embargo en las muestras de PLGA y la matriz extracelular de cerdo se realizó satisfactoriamente.
- Al realizar la repetibilidad y reproducibilidad con las muestras de PLGA y Matriz extracelular de cerdo los resultados de porosidad obtenidos demostraron la precisión del algoritmo desarrollado.
- El algoritmo desarrollado cuenta con un manejo más simple que los otros software de análisis de imágenes ya que no requiere un manejo detallado de las funciones de Matlab.
- El algoritmo desarrollado procesa de manera satisfactoria la medición de porosidad en biomateriales solos e *in vitro* debido a esto es una herramienta útil para las empresas y grupos de investigación que deseen conocer propiedades de porosidad porcentual en si biomaterial de una manera efectiva y a bajo costo.

## 10 Recomendaciones

- Profundizar y completar el método reproducibilidad y repetibilidad (r&R) con muestras en modo *in vitro* en biomateriales, de esta manera poder demostrar la procesión del método desarrollado y que este cumple con características adecuadas para lograr hacer el método repetible y reproducible con este tipo de muestras logrando medir la variación de los biomateriales en las condiciones *in vitro*.
- Realizar pruebas con diferentes materiales de esta manera lograr caracterizar materiales según la necesidad y de esta manera encontrar si existe o no una limitante para el método.
- Realizar la comparación de la técnica desarrollada comparándola con otra técnica que utilice medición de porosidad porcentual mediante análisis de imágenes.
- Complementar el algoritmo desarrollado para la lectura otras propiedades como área, perímetro tamaño de poro, etc.
- Configurar y probar el algoritmo con imágenes obtenidas de método diferentes a microscopia óptica.

## 11 Referencias

- Abramowitz, D., Davidson, M. W., & Abramowitz, M. (2008). OPTICAL MICROSCOPY. New York. Retrieved from <http://www.olympusmicro.com/primer/microscopy.pdf>
- Albaladejo A. (2008). Métodos de investigación in vitro de los factores que afectan la durabilidad de la adhesión a dentina. *Av. Odontoestomatol*, 24, 10. Retrieved from <http://scielo.isciii.es/pdf/odonto/v24n4/original3.pdf>
- Andres Fernando Burgos. (2010). Evaluación de la porosidad en las partículas. In *Porosidad* (Forward, pp. 85–89). Mexico. Retrieved from [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lim/davila\\_n\\_jr/capitulo6.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lim/davila_n_jr/capitulo6.pdf)
- ASTM. (2010). ASTM F2451 - 05(2010) Standard Guide for in vivo Assessment of Implantable Devices Intended to Repair or Regenerate Articular Cartilage. Retrieved from <https://www.astm.org/Standards/F2451.htm>
- ASTM. (2015a). ASTM C1674 - 11 Standard Test Method for Flexural Strength of Advanced Ceramics with Engineered Porosity (Honeycomb Cellular Channels) at Ambient Temperatures. Europa. Retrieved from <https://www.astm.org/Standards/C1674.htm>
- ASTM. (2015b). ASTM F1854 - 15 Standard Test Method for Stereological Evaluation of Porous Coatings on Medical Implants. <http://doi.org/10.1520/F1854-15>
- Athanasίου, K. A., Agrawal, C. M., Barber, F. A., & Burkhart, S. S. (1998). Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, 14(7), 726–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9788368>
- B.L. Seala, T.C. Oterob, & A. Panitch. (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering*, 34(4-5), 147–230. [http://doi.org/10.1016/S0927-796X\(01\)00035-3](http://doi.org/10.1016/S0927-796X(01)00035-3)
- Borko Furht, & Ankur Agarwal. (2013). *Handbook of Medical and Healthcare Technologies*. (B. Furht & A. Agarwal, Eds.) *Tissue engineering triangle and its development*. New York, NY: Springer New York. <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-8495-0>
- Brown University. (2012). *Matlab Total Academic Headcount (TAH) Toolboxes*. US. Retrieved from <https://www.brown.edu/information-technology/knowledge-base/article/1633>
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2007). *Biología*. Ed. Médica Panamericana.
- Canny, J. (1986). A Computational Approach to Edge Detection. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, PAMI-8(6), 679–698. <http://doi.org/10.1109/TPAMI.1986.4767851>
- Chang, L. H. A. O. C. F. (2006). *Sistema de computación para análisis de registro de pozos con la autonomía de resultados*. Escuela superior politecnica del litoral. Retrieved from [http://www.cib.espol.edu.ec/Digipath/D\\_Tesis\\_PDF/D-36041.pdf](http://www.cib.espol.edu.ec/Digipath/D_Tesis_PDF/D-36041.pdf)
- Chu, P. (2013). *Biomaterials Fabrication and Processing Handbook*. (X. Liu, Ed.) (1st ed.). New York: CRC Press.
- Claudia I. Guevara, Gloria Romero de Pérez, M. L. C. & E. D. (2006). Desarrollo de una biocerámica biomimética para uso específico en odontología. *Academia Colombiana*

- De Ciencias*, XXX, 596 – 602. <http://doi.org/0370-3908>.
- DeCS. (2016a). Matriz extracelular. Decs . Retrieved from <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/>
- DeCS. (2016b). Porosidad. DeCs. Retrieved from <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/>
- Douglas B. Murphy. (2001). *FUNDAMENTALS OF LIGHT MICROSCOPY AND ELECTRONIC IMAGING*. England: Wiley-Liss. Retrieved from <http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/book.pdf>
- Duffo, G. (2011). *Materiales y materias primas - Biomateriales*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Retrieved from <http://www.inet.edu.ar/wp-content/uploads/2012/11/biometales.pdf>
- E. Biermans, L. Molina, K. J. Batenburg, S. Bals, and G. V. T. (2010). Measuring porosity at the nanoscale by quantitative electron tomography. *NanoLetters* , 10. <http://doi.org/10.1021/nl103172r>
- Elizondo, M. C. J. J. E. (2002). *Matlab e Interfaces Gráficas*. Mexico.
- Eynard, A. R., Valentich, M. A., & Rovasio, R. A. (2008). *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*. (M. P. S.A., Ed.) (4th ed.). Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana.
- Fossard, A. (2005, February 1). Desarrollo de andamios porosos biodegradables 3D para la ingeniería de tejidos. Universitat Politècnica de Catalunya. Retrieved from <http://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/3236>
- Fotograff. (2012). Extensiones de archivos de imagen. US. Retrieved from <http://fotograff.com.co/2012/06/extensiones-de-archivos-de-imagen.html>
- García, P. P. G. (2013). *Reconocimineto de imagenes utilizando redes neuronales artificiales*. Universidad Complutense Madrid.
- Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. V. (2014). An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 3640–59. <http://doi.org/10.3390/ijms15033640>
- Ghanbarzadeh, B., & Almasi, H. (2013). Biodegradable Polymers. *University of Tabriz*, 6, 200. <http://doi.org/10.5772/56230>
- Gil, F. A. M., & Quetglás, G. M. (2003). *Introducción a la programación estructurada en C*. (P. Fuster, Ed.) (1st ed.). Valencia, España: Universitat de València.
- Gòmez, M. D. (2009). *Reconocimiento de caracteres opticos OCR por medio de correlación y redes neuronales*. Universidad Pontificia Bolivariana.
- González, G. F. J. (2009). *REDES NEURONALES APLICADAS AL ANÁLISIS DE IMÁGENES PARA EL DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE UN SISTEMA DE SEGURIDAD*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Guzman, Z. (2003). Aplicación Metrológica de los Estudios r&R (Repetibilidad y Reproducibilidad). *Metas & Metrólogos Asociados*. Mexico. Retrieved from <http://www.metas.com.mx/guiamet/La-Guia-MetAs-03-11-r-R.pdf>
- ICONTEC(NTC). (2015). Salud y ambiente.
- ImageJ. (2007). *Examples of Image Analysis Using ImageJ Area Measurements of a Complex Object*. US. Retrieved from <https://imagej.nih.gov/ij/docs/pdfs/examples.pdf>
- ISO. (2015). Porosity, materials.
- ISO internacional. (2012). ISO 14610:2012 □ Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) -- Test method for flexural strength of porous ceramics at room

- temperature. Retrieved from [http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=54898](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=54898)
- ISO internacional. (2014). SO 10545-3:1995 Ceramic tiles -- Part 3: Determination of water absorption, apparent porosity, apparent relative density and bulk density. Retrieved from [http://www.iso.org/iso/catalogue\\_detail.htm?csnumber=18617](http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=18617)
- ISO International. (2010). ISO 4793:1980 □ Laboratory sintered (fritted) filters -- Porosity grading, classification and designation. Retrieved from [http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=10772](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=10772)
- Ji-ru, Z., Yuan-zhi, L., & Zu-de, L. (2004). Quantitative Analysis of Micro-porosity of Eco-material by Using SEM Technique \*. *Journal of Wuhan University of Technology - Mater. Sci. Ed*, 19(2), 3.
- Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474–5491. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>
- Knuth, D. E. (1980). *Algoritmos fundamentales*. (M. Antscherl, Ed.) (1st ed.). Barcelona, España: Reverte.
- Lizarbe, M. A. (2007). SUSTITUTIVOS DE TEJIDOS: DE LOS BIOMATERIALES A LA INGENIERÍA TISULAR. *Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 101(1), 227–249.
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3(3), 1377–1397. <http://doi.org/10.3390/polym3031377>
- Mendez, A. (2006). EVALUACIÓN DE LA POROSIDAD EN LAS PARTICULAS. In *Estudio del nuevo bus de automoción Flexray y diseño de un prototipo ilustrativo de la tecnología* (p. 7).
- Ministerio Nacional De Vias. (2003). *GRAVEDAD ESPECÍFICA DE MATERIALES ASFALTICOS SÓLIDOS Y SEMISÓLIDOS*. INV. colombia. Retrieved from [ftp://ftp.unicauca.edu.co/Facultades/FIC/IngCivil/Especificaciones\\_Normas\\_INV-07/Normas/Norma INV E-707-07.pdf](ftp://ftp.unicauca.edu.co/Facultades/FIC/IngCivil/Especificaciones_Normas_INV-07/Normas/Norma INV E-707-07.pdf)
- Muratore Moreno, D. G., & P Rodríguez Alvarez, D. J. (2003). Biomateriales cerámicos, 17, 1.
- Navarrete, L. (2014). *MATERIALES PARA PRÓTESIS INTERNAS*. Ecuador.
- Otero, J. C. (2008). *Bioadhesividad celular sobre superficies de armazones o matrices tisulares* José Couceiro Otero. Retrieved from [www.tdx.cat/bitstream/10803/4313/1/jco1de1.pdf](http://www.tdx.cat/bitstream/10803/4313/1/jco1de1.pdf)
- Oxford. (2016). Algorithm. Oxford University Press. Retrieved from <http://www.oxfordlearnersdictionaries.com/us/definition/english/algorithm?q=algorithm>
- PubMed - MeSH. (2015). In Vitro Techniques. United States : NCBI. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68066298>
- Rezaei, A., & Mohammadi, M. R. (2013). In vitro study of hydroxyapatite/polycaprolactone (HA/PCL) nanocomposite synthesized by an in situ sol-gel process. *Materials Science and Engineering: C*, 33(1), 390–396. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.004>
- Ríos H, Janet Cepero Cañas, L., Natalia Davidenko, D., Rosa Krael, L., Annia González Pérez, T., Kenya Pérez, T., & Bello Gárciga, J. L. (2001). EVALUACIÓN

TOXICOLÓGICA IN VITRO DE MATERIALES POLIMÉRICOS DE RESTAURACIÓN DENTAL COMPUESTOS POR BIS-GMA. *Anuario Toxicología*, 1(1), 65–72.

- Rosas, J. E., & Pedraz, J. L. (2007). Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica SUMMARY PLGA Microspheres: A controlled release system of molecules with immunogenic activity. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*, 36(2), 134–153.
- Samira Hervella Azouzi. (2006). *Editor de imágenes basado en Regiones. Aplicación en entorno Matlab*. Escola Universitaria d'Enginyeria tècnica Industrial de Terraza.
- Snyder, R. W., & Helmus, M. N. (2004). CARDIOVASCULAR BIOMATERIALS. *Digitla Engineering Library*, 12.
- Van de Velde, K., & Kiekens, P. (2002). Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing*, 21(4), 433–442. [http://doi.org/10.1016/S0142-9418\(01\)00107-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9418(01)00107-6)
- Winkle, M. M. 1; †; D. D. 1; T. (2010). Advances in Porous Biomaterials for Dental and Orthopaedic Applications. *Materials*, 3, 2947–2974. <http://doi.org/10.3390>
- Yong Ming, J., KDV Yarlagadda, P., Chandrasekharan, M., & Yong Ming Shyan, J. (2005). Recent Advances and Current Developments in Tissue Scaffolding. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 15(3), 159–177.