

Doctorado en Ingenierías Química, Mecánica y de Fabricación

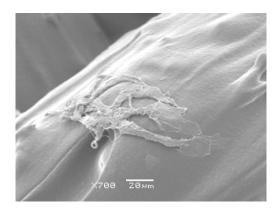
Las Palmas de Gran Canaria, septiembre de 2018

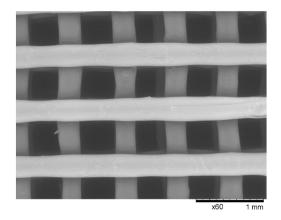
# FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE BIOMATERIALES PARA SU USO CON FINES BIOMÉDICOS UTILIZANDO FABRICACIÓN ADITIVA

María Elena Alemán Domínguez

#### **Directores:**

Antonio Nizardo Benítez Vega Zaida Cristina Ortega Medina







# D/D<sup>a</sup> Mario Domingo Monzón Verona COORDINADOR/A DEL PROGRAMA DE DOCTORADO Ingenierías Química, Mecánica y de Fabricación

#### DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

Que la Comisión Académica del Programa de Doctorado, en su sesión de fecha 3-9-2018 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "Formulación, caracterización y evaluación de biomateriales para su uso con fines biomédicos utilizando fabricación aditiva" presentada por la doctoranda Da María Elena Alemán Domínguez y dirigida por el Doctor Antonio Nizardo Benítez Vega y la Doctora Zaida Cristina Ortega Medina, solicitando la Mención Internacional por disponer de los requisitos para ello de acuerdo con el Arto 18 del Reglamento de Estudios de Doctorado.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Art<sup>o</sup> 11 del Reglamento de Estudios de Doctorado (BOULPGC 7/10/2016) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a diez de septiembre de dos mil dieciocho





El Director,

# UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA ESCUELA DE DOCTORADO

Programa de doctorado Ingenierías Química, Mecánica y de Fabricación

#### Título de la Tesis

Formulación, caracterización y evaluación de biomateriales para su uso con fines biomédicos utilizando fabricación aditiva

Tesis Doctoral presentada por D<sup>a</sup> María Elena Alemán Domínguez

Dirigida por el Dr. D. Antonio Nizardo Benítez Vega

Codirigida por la Dra. D<sup>a</sup>. Zaida Cristina Ortega Medina

La Codirectora,

La Doctoranda,

Las Palmas de Gran Canaria, a 3 de septiembre de 2018

#### **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores, Zaida Ortega y Nizardo Benítez, por el apoyo brindado desde antes del desarrollo de esta tesis doctoral, desde la realización del PFC que precede a este trabajo. Gracias por estar siempre ahí.

A todos mis compañeros del grupo de investigación, quienes han hecho más ameno el camino y me han ayudado en diferentes aspectos de este trabajo.

I would like to thank Professor Liu and Professor Wang for offering me the opportunity of working in their research groups at the University College of London and Xi'an Jiaotong University and for their nice and kind help. Thanks also to all the members of their groups who has helped me. Thanks also to Mario Monzón for his support with these secondments.

Este trabajo ha sido financiado a través del contrato predoctoral de la convocatoria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria de 2014, con el código PIFULPGC-2014-ING-ARQU-2.

Por último, a nivel personal gracias a los que me han ayudado de diferentes maneras a llegar a este momento: a Ricardo, a Minerva y, especialmente, a mi madre, quien se ha dejado la piel para brindarme toda su ayuda. A mi padre.



#### **RESUMEN**

La policaprolactona es un biomaterial ampliamente utilizado en el Estado del Arte para la fabricación de estructuras soporte (*scaffolds*) para la regeneración de hueso. Además, sus características térmicas, reológicas y mecánicas son apropiadas para su empleo como material de alimentación en procesos de fabricación aditiva basados en la extrusión de material fundido. Este tipo de métodos de fabricación ofrecen una alta flexibilidad de diseño y la posibilidad de obtener estructuras con una porosidad interconectada y definida, lo que es de gran interés para la obtención de *scaffolds* adaptados a diferentes aplicaciones de Ingeniería de Tejidos.

Sin embargo, la hidrofobicidad de la policaprolactona provoca que su superficie no ofrezca unas características adecuadas para el anclaje y la proliferación celulares. Para aumentar la hidrofilicidad de las estructuras soporte de base policaprolactona y, en consecuencia, su afinidad celular, se han propuesto diferentes estrategias. Las propuestas valoradas en el Estado del Arte pueden clasificarse en dos grandes bloques: los tratamientos superficiales y las modificaciones del material mediante la introducción de aditivos o la formulación de mezclas con otros materiales termoplásticos.

En este trabajo se analizan propuestas de ambos bloques. Por una parte, se ha valorado la introducción de dos aditivos de base celulósica para la obtención de composites de matriz de policaprolactona. Por otra, se propone un tratamiento superficial basado en el recubrimiento de las estructuras de policaprolactona con extracto de aloe vera.

A continuación, se presenta una descripción breve de las principales características de ambas propuestas, así como un resumen de los resultados que se han obtenido a lo largo de los ensayos experimentales realizados.

#### COMPOSITES DE BASE POLICAPROLACTONA

Los aditivos empleados para la formulación de composites de base policaprolactona han sido la celulosa microcristalina (MCC) y la carboximetilcelulosa de sodio (CMC). En el primer caso, ha sido posible obtener piezas mediante fabricación aditiva que contienen un 2%, un 5% y un 10% (p/p) de aditivo. Sin embargo, en el caso de la carboximetilcelulosa de sodio, los porcentajes que pudieron aplicarse fueron de un 2% y un 5% (p/p). El límite de aditivo que puede emplearse se justifica por los problemas de procesabilidad que presentaban las mezclas con un alto contenido de aditivo y que hicieron inviable la impresión tridimensional de esas combinaciones.

En ambos casos, la introducción de aditivo implica un incremento de la hidrofilicidad del material, lo que se evidencia en los datos de absorción de agua y tampón fosfato salino (PBS), tanto por métodos gravimétricos como termogravimétricos. Si se comparan los composites obtenidos por la introducción con carboximetilcelulosa con los obtenidos por aditivación con celulosa microcristalina,



es posible comprobar que los primeros tienen una capacidad de hinchado muy superior a los segundos.

En ambos casos, un bajo porcentaje de aditivo implica un incremento de la cristalinidad del material, lo que se evidencia con los resultados del análisis del comportamiento térmico del material, así como por su espectro infrarrojo. Este aumento de la cristalinidad del material se justifica por el efecto de nucleación que ofrecen las partículas de aditivo. Sin embargo, cuando la concentración de aditivo se incrementa, este efecto disminuye debido a que la aglomeración que se produce dificulta la interacción entre la matriz y las partículas de aditivo durante el proceso de cristalización del material. El incremento de la cristalinidad justifica el incremento de la rigidez que se observa en los materiales composite frente al material puro. El efecto de nucleación es más evidente en el caso del empleo de la celulosa microcristalina como aditivo, obteniéndose como consecuencia un efecto de refuerzo no observable en el caso de la carboximetilcelulosa.

En cuanto a la morfología de las piezas, cabe destacar que la presencia del aditivo dificulta el proceso de impresión, lo que provoca la aparición de microporos en los filamentos que conforman la estructura tridimensional de las piezas. La aparición de estos microporos provoca que el incremento de la rigidez relacionado con la mayor cristalinidad de la matriz anteriormente mencionado no implique un incremento de las propiedades mecánicas de las estructuras porosas proporcional a la cantidad de aditivo introducido. De esta forma, las estructuras con un mayor porcentaje de aditivo presentan una cantidad tal de microporos en los filamentos que la adhesión entre capas se ve afectada y, en consecuencia, empeora el comportamiento mecánico de las estructuras.

La afinidad celular, por su parte, se ha cuantificado a través de la determinación de la viabilidad celular de células mesenquimales cultivadas sobre estructuras tridimensionales obtenidas con los composites con diferentes concentraciones de aditivo. En estos términos, la introducción de celulosa microcristalina mejora los resultados tanto para los ensayos realizados sobre muestras macizas de material como para los que se realizaron con estructuras porosas tridimensionales. Sin embargo, tal como ocurría para el comportamiento mecánico, esta mejora no es proporcional a la cantidad de aditivo introducido, sino que existe un valor máximo de la viabilidad para bajas concentraciones de celulosa microcristalina. En el caso de la carboximetilcelulosa, por su parte, el ensayo realizado con piezas macizas (realizado con fibroblastos de ratón) no proporciona diferencias entre las piezas de policaprolactona pura y las piezas de material composite. Por su parte, el ensayo sobre piezas tridimensionales se realizó exclusivamente con muestras que contienen un 2% (p/p) de carboximetilcelulosa, obteniéndose una mejora de los resultados cuando se comparan con los correspondientes a la policaprolactona pura.

Sin embargo, el hecho de que en las piezas macizas no se observen mejoras en el caso de la carboximetilcelulosa, pero sí en el caso de la celulosa microcristalina permite concluir que esta última es un mejor candidato como aditivo capaz de mejorar la afinidad celular. Cuando se contrastan los datos de ensayos biológicos con los de hidrofilicidad, se puede encontrar una justificación a este comportamiento,



puesto que es posible que la alta hidrofilicidad de las estructuras que contienen carboximetilcelulosa dificulte la etapa inicial de adsorción de proteínas, crucial para el anclaje posterior de las células.

#### RECUBRIMIENTO CON EXTRACTO DE ALOE VERA

El extracto de aloe vera empleado en este estudio ha sido una muestra de producto comercial sobre el que se han realizado muy pocas modificaciones (centrifugación y ajuste de pH) para su empleo como recubrimiento de las estructuras de policaprolactona.

El recubrimiento con aloe vera se ha realizado por inmersión de las piezas previamente tratadas con plasma de oxígeno a 30 W de potencia y durante 5 minutos. El extracto empleado fue ajustado a diferentes valores de pH con el fin de comprobar si este parámetro afecta a las propiedades finales del recubrimiento.

Con respecto a la etapa de caracterización, los ensayos de viabilidad celular realizados sobre un cultivo de fibroblastos L929 demostraron la efectividad del recubrimiento de aloe vera como forma de incrementar la afinidad celular de las estructuras de policaprolactona. De hecho, los valores obtenidos para las piezas recubiertas fueron superiores a los proporcionados por las piezas tratadas exclusivamente con plasma. Dado que el tratamiento con plasma es una de las opciones más ampliamente estudiadas en el estado del arte como forma de mejorar la bioafinidad de la policaprolactona, la comparativa realizada en esta tesis doctoral permite definir el potencial de los recubrimientos de aloe vera para tal fin.

#### **CONCLUSIONES**

Los resultados de la presente tesis doctoral han permitido definir una serie de estrategias destinadas a la mejora de las propiedades de la policaprolactona para la obtención de piezas porosas mediante fabricación aditiva para su aplicación en la regeneración ósea.

La comparativa de los datos de los ensayos de caracterización obtenidos para los dos tipos de composite analizados permite concluir la mayor idoneidad de los materiales basados en combinaciones policaprolactona:celulosa microcristalina (PCL:MCC) frente obtienen mediante las los que se mezclas policaprolactona: carboximetil celulosa (PCL:CMC). Esta conclusión se justifica por la mejor procesabilidad de los primeros mediante los procesos de extrusión empleados en este estudio, así como por su comportamiento mecánico (las muestras PCL:MCC presentan una mayor rigidez que las muestras PCL:CMC).

Por su parte, los ensayos de viabilidad celular muestran el potencial de los recubrimientos de aloe vera como forma de mejorar la afinidad celular de estructuras porosas obtenidas por fabricación aditiva de policaprolactona. Sin



embargo, el empleo de recubrimientos tiene la limitación de la desaparición del efecto de mejora una vez se haya biodegradado el mismo.

Por ello, sería interesante como continuación del trabajo realizado evaluar el potencial de estructuras composite policaprolactona: celulosa microcristalina recubiertos con extracto de aloe vera siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el presente documento.



#### SUMMARY

Polycaprolactone (PCL) is a biomaterial that has been widely used in the State of the Art for the manufacturing of porous scaffolds for bone tissue engineering. Its thermal, mechanical and rheological behaviour makes it suitable to be used as feedstock for extrusion-based additive manufacturing techniques. This type of manufacturing process provides design flexibility and the possibility of obtaining an interconnected and defined porosity. These characteristics are useful for the manufacturing of the scaffolds that will support the growth of bone tissue in Tissue Engineering applications.

However, the hydrophobicity of polycaprolactone hinders cell attachment and proliferation on the surface of the material. Different alternatives have been explored in the literature to overcome this restriction of polycaprolactone for Tissue Engineering applications. These alternatives can be classified into two groups: surface treatments and bulk material modifications. Bulk material modifications consist in either filling the material with additives able to change the properties of the matrix or blending it with another biodegradable thermoplastic.

In this work, proposals from both groups have been analysed. On the one hand, the introduction of cellulosic compounds (microcrystalline cellulose and carboxymethylcellulose) in the polycaprolactone matrix has been evaluated as a strategy to obtain polycaprolactone-based composites. On the other hand, a surface treatment based on the coating with aloe vera extract has been proposed as a way of increasing the cell affinity of polycaprolactone surfaces.

In the next sections, the main characteristics of both proposals will be briefly described. Furthermore, a summary of the results is also shown.

#### POLYCAPROLACTONE-BASED COMPOSITES

Microcrystalline cellulose (MCC) and sodium carboxymethylcellulose (CMC) are the two additives used in this work to obtain polycaprolactone-based composites. It was possible to obtain PCL:MCC 3D printed samples containing 2%, 5% and 10% (wt:wt) of the additive. However, for PCL:CMC blends, the amounts of additive that allowed a suitable deposition process were 2% and 5% (wt:wt). The upper limit of the concentration of the additives was established regarding the processability of the composites.

For both additives, composite structures and/or bulk samples have a higher hydrophilicity than pure polycaprolactone equivalent parts. This conclusion is confirmed by the swelling data (for water and PBS) obtained from the gravimetric and thermogravimetric analysis carried out in this work. When these data are compared, it is possible to observe that the effect is more pronounced for the PCL:CMC structures than for the PCL:MCC ones.

It is possible to highlight also the increase in the crystallinity for both types of composites, as evidenced by the thermal analysis and FTIR spectra. This increase can



be explained by the nucleating effect of the additive particles in the thermoplastic matrix. Nevertheless, when their concentration is increased, this effect is hindered since the agglomeration among particles does not allow a suitable matrix-additive interaction during the crystallization process. For this reason, the increase of crystallinity is not linear with the concentration of the filler. On the other hand, the fact that the composites have a more crystalline matrix than the pure polycaprolactone samples is an explanation for understanding the increase in stiffness shown by the mechanical characterization of composite parts. This effect is more relevant for the PCL:MCC composites. As a consequence, the reinforcement effect on the mechanical properties is significant for these composites but not for the PCL:CMC ones.

Regarding the morphology of the 3D printed parts, it is possible to highlight that the presence of the additives hinders the deposition process. This implies the formation of micropores in the filaments that define the 3D structure. As a consequence, the above mentioned increase of stiffness is not enough to provide a reinforcement effect when the amount of micropores is too high, as the layer-to-layer adhesion is decreased due to these pores.

Finally, the cell affinity has been quantified in terms of viability of cells cultured on the surface of composite and pure polycaprolactone samples (both 3D printed and bulk ones). In this evaluation, polycaprolactone:microcrystalline cellulose samples provide improved results compared to the pure polycaprolactone samples for both types of tests (3D and 2D; sheep mesenchymal cells). However, this improvement is not linear with the amount of additive in the matrix, but there are maximum values for cell viability located at low additive's concentration values. On the other hand, for PCL:CMC the cell culture carried out on 2D samples (mouse fibroblasts) did not show any significant difference between the composite and the pure polycaprolactone samples. However, for 3D printed samples containing 2% CMC (wt:wt) it is possible to observe an improvement of the results when compared to pure polycaprolactone scaffolds.

This difference between the two additives can be used as an evidence to conclude the more suitable behaviour of microcrystalline cellulose to provide an improvement of polycaprolactone-based scaffolds. The explanation of this difference could be based on the excessive hydrophilicity of PCL:CMC composites. The swelling analysis shows that these composites are able to absorb a higher amount of water than the PCL:MCC ones. It is possible that the hydrophilicity of the matrix has been increased up to a point where the extracellular proteins are not able to interact efficiently with the surface. As this protein-surface interaction is a crucial stage of the cell colonization process, this limitation would hinder the cell attachment and proliferation on the surface of the composite samples. Nevertheless, the mechanism to understand how the additive modifies the cell affinity of the material is complex and further research is needed in order to deeply characterize this interaction.



#### ALOE VERA EXTRACT COATING

The aloe vera extract used in this study has been a commercial sample which has been scarcely modified (centrifugation and pH adjustment) before its use as coating of polycaprolactone structures.

The coating process consists of the immersion of the samples that have been previously subjected to oxygen plasma treatment at 30 W for 5 minutes. The extract was used at different pH values in order to evaluate how this parameter affects to the final properties of the coating.

Regarding the characterization, the L929 fibroblasts cell viability results show the effectiveness of the aloe vera coating as a strategy to increase the cell affinity of the polycaprolactone structures. In fact, the data provided by the coated samples were higher than the data from plasma treated samples. Plasma treatment is the most relevant surface modification in the state of the art to improve the hydrophilicity and cell affinity of polycaprolactone-based scaffolds. Therefore, the comparative between the aloe vera coated and the plasma treated structures is relevant in order to confirm the potential of the coating for bone Tissue Engineering applications.

#### CONCLUSIONS

The results obtained in this PhD thesis have been useful to define different strategies to improve the properties of polycaprolactone-based scaffolds obtained by additive manufacturing techniques for bone regeneration.

The comparison of the data from the composite samples characterization allows to conclude that PCL:MCC blends have more suitable properties than PCL:CMC ones. This conclusion is based on the better processability of the first type of composites for extrusion based additive manufacturing and on their mechanical behaviour (the stiffness is higher for PCL:MCC structures than for PCL:CMC ones).

On the other hand the cell viability analysis show the potential of the aloe vera extract coatings as an alternative to improve the cell affinity of polycaprolactone scaffolds obtained by additive manufacturing. However, the utilization of coatings has the intrinsic disadvantage of their disappearance by their biodegradation at early stages of osseointegration.

For that reason, it is possible to state the evaluation of this coating on composite PCL:MCC scaffolds as an interesting complement to the work presented in this PhD thesis. This combination would allow to take advantage of the positive aspects of both strategies: the modification of the bulk material and its surface treatment.



## **ÍNDICE GENERAL**

Capítulo 1. Introducción.	
1.1. Objetivos	1
1.2. Estructura del documento	2
Capítulo 2. Revisión del estado del arte.	
2.1. Introducción	4
2.2. Ingeniería de tejidos	4
2.2.1. Importancia económica de la ingeniería de tejidos	6
2.3. Fabricación de estructuras soporte para la regeneración celular (scaffol	ds) 6
2.3.1. Técnicas de fabricación	7
2.3.2. Fabricación aditiva en la regeneración de tejidos	8
2.3.2.1. Técnicas basadas en procesos de fotopolimerización	9
2.3.2.2. Técnicas basadas en sinterizado láser	10
2.3.2.3. Técnicas basadas en procesos de extrusión	11
2.4. Regeneración de tejido óseo	12
2.4.1. Estructura del tejido óseo	13
2.4.1.1. Matriz ósea	14
2.4.1.2. Células óseas	14
2.4.2. Tipos de tejido óseo	16
2.4.3. La ingeniería de tejidos en la regeneración de tejido óseo	17
2.5. Materiales empleados en la regeneración de tejido óseo	20
2.5.1. Materiales metálicos	21
2.5.2. Materiales cerámicos	22
2.5.3. Materiales poliméricos	23
2.5.3.1. Materiales poliméricos sintéticos	25
2.5.3.1.1. Policaprolactona	26
2.5.3.2. Materiales poliméricos de origen natural	30
2.5.3.2.1. Celulosa microcristalina	33
2.5.3.2.2. Carboximetilcelulosa	34
2.5.3.2.3. Polisacáridos del Aloe vera	36
2.6. Tratamientos superficiales para el incremento de la adhesión con estructuras soporte poliméricas	
2.6.1. Tratamiento con plasma	39

2.6.1.1. Tratamientos con plasma aplicados a estructuras de Policaprolac	tona .40
2.7. Conclusiones	42
2.8. Referencias	43
2.9. Índice de figuras	54
2.10. Índice de tablas	55
Capítulo 3. Formulación de materiales y métodos de caracterización.	
3.1. Introducción	
3.2. Preparación de materiales composites	
3.3. Propiedades de flujo de las combinaciones de materiales propuestas	
3.3.1. Clasificación de los fluidos en función de su viscosidad	
3.3.2. Modelización del comportamiento de flujo	
3.3.2.1. Curvas de viscosidad	60
3.3.2.2. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad	61
3.3.2.3. Modelos de viscosidad	62
3.3.3. Obtención de datos de viscosidad	63
3.4. Métodos de caracterización de láminas de materiales composites	69
3.4.1. Análisis termogravimétrico y calorimétrico	69
3.4.2. Retención de fosfato tampón salino (PBS) y agua	72
3.4.3. Medición del ángulo de contacto	73
3.4.4. Análisis cualitativo de la distribución de partículas	74
3.4.5. Espectroscopía infrarroja	75
3.4.6. Difracción de Rayos X (DRX)	76
3.4.7. Ensayos de tracción	78
3.4.8. Cultivo celular y evaluación de la proliferación celular	78
3.5. Fabricación de estructuras tridimensionales de materiales composites	
3.6. Métodos de caracterización de estructuras tridimensionales de m composites	
3.6.1. Morfología	83
3.6.1.1. Observación microscópica	83
3.6.1.2. Observación en microCT	84
3.6.1.3. Porosidad	
3.6.2. Ensayos mecánicos	
3.6.2.1. Ensayo de compresión	
3.6.2.2. Ensayo de flexión en tres puntos	
·	

3.6.3. Cultivo celular y evaluación de la proliferación celular	88
3.7. Análisis estadístico	89
3.8. Tratamiento superficial de muestras de policaprolactona	89
3.8.1. Procedimiento de recubrimiento con extracto de aloe vera	90
3.8.2. Fabricación de estructuras tridimensionales para posterior tra superficial	
3.9. Caracterización química de las superficies	92
3.9.1. Espectroscopía infrarroja	92
3.9.2. Método de la toluidina	92
3.9.3. Medición del ángulo de contacto	93
3.9.4. Análisis elemental por energía dispersiva de rayos X	94
3.10. Evaluación biológica del efecto de los tratamientos superficiales	95
3.10.1. Cultivo celular	95
3.10.2. Determinación de la viabilidad celular	96
3.10.3. Tinción células vivas/células muertas	97
3.11. Conclusiones	98
3.12. Referencias	100
3.13. Índice de figuras	103
3.14. Índice de tablas	105
Capítulo 4. Evaluación de la introducción de la celulosa microcristalia aditivo.	na como
4.1. Introducción	106
4.2. Propiedades de flujo de mezclas de policaprolactona y celulosa microcristal	ina 107
4.3. Caracterización de láminas de material composite policaprolactona microcristalina	
4.3.1. Análisis termogravimétrico y calorimétrico	
4.3.2. Retención de tampón fosfato salino (PBS) y agua	
4.3.3. Ángulo de contacto	
4.3.4. Análisis cualitativo de la distribución de partículas	
4.3.5. Espectroscopía infrarroja	
4.3.6. Difracción de Rayos X (DRX)	
4.3.7. Ensayos de tracción	
4.3.8. Cultivo celular y evaluación de la proliferación celular	
4.4. Fabricación de las estructuras tridimensionales	
ab action ac tab con actains a familiarioriated infinition	20

4.5.1. Morfología de las estr	ructuras tridimensionales
4.5.1.1. Observación en m	nicroCT
4.5.1.2. Porosidad	
4.5.2. Ensayos mecánicos	
4.5.2.1. Ensayos de comp	resión
4.5.2.2. Ensayos de flexió	on en tres puntos134
4.5.3. Estudio de la hidrofil	icidad mediante el análisis de la absorción de PBS 136
4.5.4. Ensayos biológicos	
4.6. Conclusiones	
4.7. Bibliografía	
4.8. Índice de figuras	
4.9. Índice de tablas	
5.2. Propiedades de flujo	
<ul><li>5.2. Propiedades de flujo</li><li>5.3. Caracterización policaprolactona: carboximetil</li><li>5.3.1. Termogravimetría</li></ul>	
<ul><li>5.2. Propiedades de flujo</li><li>5.3. Caracterización policaprolactona: carboximetil</li><li>5.3.1. Termogravimetría</li><li>5.3.2. Retención de tampón</li></ul>	de láminas de material composite celulosa
<ul><li>5.2. Propiedades de flujo</li><li>5.3. Caracterización policaprolactona:carboximetil</li><li>5.3.1. Termogravimetría</li><li>5.3.2. Retención de tampón</li><li>5.3.3. Ángulo de contacto</li></ul>	
<ul> <li>5.2. Propiedades de flujo</li> <li>5.3. Caracterización policaprolactona: carboximetil</li> <li>5.3.1. Termogravimetría</li> <li>5.3.2. Retención de tampón</li> <li>5.3.3. Ángulo de contacto</li> <li>5.3.4. Análisis cualitativo de</li> </ul>	de láminas de material composite celulosa
<ul> <li>5.2. Propiedades de flujo</li> <li>5.3. Caracterización policaprolactona: carboximetil 5.3.1. Termogravimetría</li> <li>5.3.2. Retención de tampón 5.3.3. Ángulo de contacto</li> <li>5.3.4. Análisis cualitativo de 5.3.5. Espectroscopía infrar</li> </ul>	de láminas de material composite celulosa
5.2. Propiedades de flujo 5.3. Caracterización policaprolactona:carboximetil 5.3.1. Termogravimetría 5.3.2. Retención de tampón 5.3.3. Ángulo de contacto 5.3.4. Análisis cualitativo de 5.3.5. Espectroscopía infrar 5.3.6. Ensayos de tracción	de láminas de material composite celulosa
<ul> <li>5.2. Propiedades de flujo</li> <li>5.3. Caracterización policaprolactona: carboximetil</li> <li>5.3.1. Termogravimetría</li> <li>5.3.2. Retención de tampón</li> <li>5.3.3. Ángulo de contacto</li> <li>5.3.4. Análisis cualitativo de</li> <li>5.3.5. Espectroscopía infrar</li> <li>5.3.6. Ensayos de tracción</li> <li>5.3.7. Cultivo celular y eval</li> </ul>	
<ul> <li>5.2. Propiedades de flujo</li> <li>5.3. Caracterización policaprolactona:carboximetil 5.3.1. Termogravimetría</li> <li>5.3.2. Retención de tampón 5.3.3. Ángulo de contacto</li> <li>5.3.4. Análisis cualitativo de 5.3.5. Espectroscopía infrar 5.3.6. Ensayos de tracción</li> <li>5.3.7. Cultivo celular y eval 5.4. Fabricación de las estructos.</li> <li>5.5. Caracterización</li> </ul>	
5.2. Propiedades de flujo 5.3. Caracterización policaprolactona:carboximetil 5.3.1. Termogravimetría 5.3.2. Retención de tampón 5.3.3. Ángulo de contacto 5.3.4. Análisis cualitativo de 5.3.5. Espectroscopía infrar 5.3.6. Ensayos de tracción 5.3.7. Cultivo celular y eval 5.4. Fabricación de las estruct 5.5. Caracterización policaprolactona:carboximetil	de láminas de material composite celulosa
5.2. Propiedades de flujo 5.3. Caracterización policaprolactona:carboximetil 5.3.1. Termogravimetría 5.3.2. Retención de tampón 5.3.3. Ángulo de contacto 5.3.4. Análisis cualitativo de 5.3.5. Espectroscopía infrar 5.3.6. Ensayos de tracción 5.3.7. Cultivo celular y eval 5.4. Fabricación de las estruct 5.5. Caracterización policaprolactona:carboximetil 5.5.1. Morfología de las estruct	de láminas de material composite celulosa
5.2. Propiedades de flujo 5.3. Caracterización policaprolactona:carboximetil 5.3.1. Termogravimetría 5.3.2. Retención de tampón 5.3.3. Ángulo de contacto 5.3.4. Análisis cualitativo de 5.3.5. Espectroscopía infrar 5.3.6. Ensayos de tracción 5.3.7. Cultivo celular y eval 5.4. Fabricación de las estruct 5.5. Caracterización policaprolactona:carboximetil 5.5.1. Morfología de las estruct 5.5.1.1. Observación en m	de láminas de material composite celulosa
5.2. Propiedades de flujo 5.3. Caracterización policaprolactona:carboximetil. 5.3.1. Termogravimetría 5.3.2. Retención de tampón 5.3.3. Ángulo de contacto 5.3.4. Análisis cualitativo de 5.3.5. Espectroscopía infrar 5.3.6. Ensayos de tracción 5.3.7. Cultivo celular y eval 5.4. Fabricación de las estruct 5.5. Caracterización policaprolactona:carboximetil. 5.5.1. Morfología de las estruct 5.5.1.1. Observación en m 5.5.1.2. Porosidad	de láminas de material composite celulosa

5.5.3. Estudio de la hidrofilicidad mediante el análisis de la absorción de PBS 172
5.5.4. Ensayos biológicos
5.6. Conclusiones
5.7. Referencias
5.8. Índice de figuras
5.9. Índice de tablas
Capítulo 6. Evaluación de tratamientos superficiales. Recubrimiento con aloe vera
6.1. Introducción
6.2. Caracterización del extracto de aloe vera184
6.2.1. Liofilización del extracto para su caracterización
6.2.2. Termogravimetría
6.2.3. Espectroscopía infrarroja
6.3. Caracterización de recubrimientos de aloe vera sobre láminas obtenidas mediante moldeo por compresión
6.3.1. Espectroscopía infrarroja
6.3.2. Ensayo de la toluidina
6.3.3. Ángulo de contacto
6.3.4. Ensayos biológicos193
6.4. Caracterización de las estructuras tridimensionales recubiertas con aloe vera194
6.4.1. Observación microscópica
6.4.2. Cuantificación gravimétrica de la eficiencia del procedimiento de recubrimiento
6.4.3. Análisis elemental por energía dispersiva de rayos X (EDX)
6.4.4. Ensayos biológicos
6.5. Conclusiones
6.7. Referencias204
6.8. Índice de figuras207
6.9. Índice de tablas208
Capítulo 7. Conclusiones y líneas futuras.
7.1. Conclusiones
7.1.1. Composites de base policaprolactona
7.1.2. Recubrimiento con extracto de aloe vera
7.2. Líneas futuras

7.1. Conclusions	213
7.1.1. Polycaprolactone-based composites	213
7.1.2. Aloe vera extract coating	214
7.2. Future research lines	215
Capítulo 8. Publicaciones y ponencias.	
8.1. Introducción	216
8.2. Artículos	216
8.2.1. Three-dimensional printed polycaprolactone-microcrystalline of scaffolds	
8.2.2. Tunability of polycaprolactone hydrophilicity by carboxymethyl loading	
8.3. Ponencias en congresos	218
8.3.1. Evaluation of the mechanical properties of 3D printed microcr cellulose-polycaprolactone scaffolds	-
8.3.2. Processability of microcrystalline cellulose-polycaprolactone compositions and printing	_
8.3.3. Evaluation of carboxymethyl cellulose/polycaprolactone and microcr cellulose/polycaprolactone blends	•

Capítulo 1. Introducción.

## CONTENIDO

1.1. Objetivos	••••
1.2. Estructura del documento	/

En este capítulo se definen, en primer lugar, los objetivos que han pretendido abordarse a lo largo del desarrollo de la presente tesis doctoral. En esta definición, se distinguen unos objetivos generales y unos objetivos específicos relacionados con las diferentes líneas de trabajo llevadas a cabo.

A continuación, se enumeran los capítulos que componen la presente memoria y se realiza una breve descripción de su contenido. Este apartado pretende, por tanto, introducir la estructura del documento para facilitar su comprensión y análisis.

#### 1.1. OBJETIVOS

La presente tesis doctoral tiene como principal objetivo la propuesta de diferentes estrategias para mejorar las propiedades de estructuras porosas obtenidas mediante fabricación aditiva de base policaprolactona susceptibles de ser empleadas en aplicaciones de regeneración de hueso.

Este objetivo general ha sido abordado de dos formas: mediante la formulación de materiales compuestos o composites obtenidos mediante la aditivación de la policaprolactona con derivados celulósicos (celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa) y mediante el tratamiento superficial de las estructuras para conseguir piezas recubiertas con extracto de aloe vera.

De esta forma, es posible plantear una serie de objetivos específicos para cada una de las dos estrategias propuestas:

- Con respecto a la utilización de materiales composites:
  - Formular diferentes combinaciones de composites mediante la introducción de dos aditivos: carboximetilcelulosa y celulosa microcristalina.
  - Caracterizar las propiedades de flujo de las combinaciones formuladas.
  - Determinar las condiciones de procesado necesarias para la obtención de estructuras porosas mediante fabricación aditiva.
  - Caracterizar las propiedades de las piezas tridimensionales obtenidas en material composite y comparación de los resultados con los valores de las estructuras de policaprolactona pura a fin de verificar si la introducción de los aditivos implica una modificación significativa de las propiedades mecánicas y/o de la afinidad celular de las estructuras.
- Con respecto a las estructuras recubiertas con extracto de aloe vera:
  - Caracterizar el extracto de aloe vera empleado mediante espectroscopía infrarroja y análisis termogravimétrico a diferentes valores de pH.
  - Plantear un procedimiento de recubrimiento de superficies de PCL basado en el tratamiento con plasma con oxígeno y posterior inmersión en extracto de aloe vera.
  - Caracterizar el comportamiento biológico de estructuras de policaprolactona porosas obtenidas mediante fabricación aditiva y recubiertas con el extracto de



aloe vera con el objetivo de valorar la viabilidad de este recubrimiento como forma de mejorar la afinidad celular de dichas estructuras.

Mediante el desarrollo de la presente tesis doctoral se establecen una serie de conclusiones que sirven como punto de partida para el establecimiento de nuevas líneas de investigación, tales como el empleo de diferentes materiales para la aditivación de polímeros biocompatibles con el fin de controlar determinadas propiedades del material (o de las estructuras porosas fabricadas) y con el uso de materiales de origen natural para mejorar la bioafinidad del mismo y, por tanto, favorecer el crecimiento celular.

#### 1.2. ESTRUCTURA DEL DOCUMENTO

La presente memoria se estructura en los siguientes siete capítulos:

- Capítulo 1. Introducción: Se trata del presente capítulo y pretender servir como guía para la definición de los objetivos del trabajo y para mostrar la estructura del documento.
- Capítulo 2. Revisión del Estado del Arte: En este capítulo se explica una serie de conceptos básicos que permiten contextualizar el ámbito de aplicación de los resultados que se deriven del trabajo experimental de la presente tesis doctoral. Además, incluye una revisión bibliográfica de trabajos previos centrados en objetivos similares a los abordados en este trabajo, que sirven como punto de partida y como comparativa a los resultados y conclusiones obtenidos.
- Capítulo 3. Formulación de materiales y métodos de caracterización: Este capítulo contiene la descripción del procedimiento de obtención de las formulaciones de composites utilizados, así como una breve explicación de los métodos de caracterización empleados para evaluar las propiedades de estos materiales y de las piezas tridimensionales fabricadas. Además, se incluye el procedimiento propuesto para realizar los recubrimientos con extracto de aloe vera y los ensayos llevados a cabo sobre muestras con estos recubrimientos.
- Capítulo 4. Evaluación de la introducción de celulosa microcristalina como aditivo: Se incluyen los resultados de los ensayos de caracterización, tanto de muestras de material sin procesar como de estructuras obtenidas mediante fabricación aditiva, de diferentes combinaciones de policaprolactona con este aditivo. La caracterización de muestras de material obtenidas mediante moldeo por compresión ha consistido en el estudio de sus propiedades de flujo, su análisis mediante espectroscopía infrarroja, análisis termogravimétrico, medición del ángulo de contacto, análisis de la absorción de agua y fosfato tampón salino (PBS), evaluación de sus propiedades mecánicas y realización de ensayos in vitro con el fin de evaluar el anclaje y proliferación celulares sobre la superficie del material composite. Con respecto a las piezas porosas obtenidas mediante fabricación aditiva, se ha evaluado su comportamiento mecánico a fin de establecer si los valores del módulo de elasticidad de las diferentes combinaciones obtenidas se sitúan en el rango de trabajo válido para



las aplicaciones de regeneración de hueso y si el aditivo tiene un efecto de refuerzo sobre la matriz. Además, se ha caracterizado la morfología de las piezas mediante observación microscópica y análisis de microtomografía computerizada de rayos X, con lo que se ha conseguido caracterizar la estructura interna de las piezas. Por último, se ha realizado un análisis del crecimiento de células mesenquimales sobre la superficie de las estructuras.

- Capítulo 5. Evaluación de la introducción de carboximetilcelulosa como aditivo: En este caso, se presentan y analizan los datos correspondientes a las combinaciones de materiales composite que resultan de introducir carboximetilcelulosa en una matriz de policaprolactona. Los métodos de caracterización empleados fueron análogos a los descritos en el capítulo anterior para el caso de los composites obtenidos por adición de celulosa microcristalina.
- Capítulo 6. Evaluación de tratamientos superficiales. Recubrimiento con aloe vera: En este capítulo se presentan la descripción del procedimiento propuesto para obtener superficies recubiertas con extracto de aloe vera, así como la caracterización de estas piezas recubiertas desde el punto de vista químico y biológico.
- Capítulo 7. Conclusiones y líneas futuras: Se desglosan las conclusiones globales acerca de los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo del trabajo experimental. Además, se propone una serie de líneas de trabajo que sería interesante desarrollar como continuación a la investigación que se describe en este documento. Este capítulo se presenta tanto en español como en inglés, dado que la exposición de este apartado en inglés es uno de los requisitos para obtención de la mención internacional.
- Capítulo 8. Publicaciones y ponencias: En el último capítulo se relacionan los trabajos publicados en revistas indexadas, así como las ponencias realizadas en diferentes congresos científicos.



# Capítulo 2. Revisión del Estado del Arte.

## CONTENIDO

2.1. Introducción	4
2.2. Ingeniería de tejidos	4
2.2.1. Importancia económica de la ingeniería de tejidos	6
2.3. Fabricación de estructuras soporte para la regeneración celular (scaffolds)	6
2.3.1. Técnicas de fabricación	7
2.3.2. Fabricación aditiva en la regeneración de tejidos	8
2.3.2.1. Técnicas basadas en procesos de fotopolimerización	9
2.3.2.2. Técnicas basadas en sinterizado láser	.10
2.3.2.3. Técnicas basadas en procesos de extrusión	11
2.4. Regeneración de tejido óseo	.12
2.4.1. Estructura del tejido óseo	.13
2.4.1.1. Matriz ósea	.14
2.4.1.2. Células óseas	.14
2.4.2. Tipos de tejido óseo	.16
2.4.3. La ingeniería de tejidos en la regeneración de tejido óseo	17
2.5. Materiales empleados en la regeneración de tejido óseo	.20
2.5.1. Materiales metálicos	.21
2.5.2. Materiales cerámicos	.22
2.5.3. Materiales poliméricos	.23
2.5.3.1. Materiales poliméricos sintéticos	.25
2.5.3.1.1. Policaprolactona	.26
2.5.3.2. Materiales poliméricos de origen natural	.30
2.5.3.2.1. Celulosa microcristalina	33
2.5.3.2.2. Carboximetilcelulosa	.34
2.5.3.2.3. Polisacáridos del Aloe vera	36
2.6. Tratamientos superficiales para el incremento de la adhesión celular estructuras soporte poliméricas	
2.6.1. Tratamiento con plasma	.39
2.6.1.1. Tratamientos con plasma aplicados a estructuras de Policaprolactona	ı 40
2.7. Conclusiones	.42
2.8. Referencias	.43
2.9. Índice de figuras	.54
2.10. Índice de tablas	55

#### 2.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se realiza una descripción de los principales aspectos de la ingeniería de tejidos, con especial énfasis en la fabricación de estructuras soporte para la regeneración tisular, tanto en términos de técnicas de fabricación como de materiales empleados.

El foco de esta descripción se pone en la regeneración de tejido óseo, puesto que se trata del tejido en el que se prevé un mayor ámbito de aplicación de los materiales y técnicas desarrollados en la presente tesis doctoral. En este sentido, se incluye en este capítulo una introducción a las principales características de este tejido a nivel biológico, así como una revisión bibliográfica de las principales técnicas existentes que se han empleado en la búsqueda de estrategias que permitan regenerar el tejido de manera efectiva. Se presenta, además, una recopilación de las características y principales aplicaciones de los diferentes materiales que se proponen en la literatura como potenciales soportes para la regeneración de tejido óseo, así como las principales limitaciones de cada uno de ellos.

La revisión bibliográfica justifica la utilización de la policaprolactona como material polimérico base para la formulación de los diferentes composites que se proponen en este trabajo. Por esta razón, se realiza una descripción ampliada del trabajo previo con este material así como de sus principales características.

Por otra parte, en este trabajo, se ha evaluado la posibilidad de introducir en las estructuras tridimensionales el extracto de aloe vera en forma de recubrimiento de las estructuras de policaprolactona, debido al potencial que muestra esta sustancia de origen natural en aplicaciones relacionadas con la regeneración de tejidos. En este capítulo se incluye una descripción de las principales características de esta especie vegetal, así como una revisión de los antecedentes del empleo de los extractos de aloe en aplicaciones de ingeniería tisular.

Por último, se incluye una revisión de técnicas basadas en tratamiento con plasma encaminadas a la mejora de las propiedades biofuncionales de los materiales típicamente empleados en la ingeniería de tejidos. El tratamiento con plasma ofrece la posibilidad de introducir grupos funcionales carboxilo e hidroxilo en la superficie del material de una manera relativamente simple. Por esta razón, se plantea el empleo de esta técnica como paso previo a la etapa de recubrimiento con aloe vera, ya que se espera que proporcione grupos funcionales en la superficie de la policaprolactona capaces de interactuar con los componentes presentes en el extracto.

#### 2.2. INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos es una rama científica interdisciplinar en la que intervienen campos de las ciencias de la salud, la ingeniería de materiales, la ingeniería mecánica y las ciencias básicas. Su objetivo principal es el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de un determinado tejido.¹ El desarrollo de estos sustitutos se desarrolla, fundamentalmente, a través de tres tipos de estrategias <sup>2</sup>:



- Trasplante directo de células o microtejidos en el seno del tejido dañado.
- Encapsulación de células.
- Implantación de *scaffolds* que contienen las células promotoras de la regeneración del tejido dañado.

Los scaffolds o andamios celulares son estructuras tridimensionales empleadas en ingeniería tisular para direccionar el crecimiento de cultivos celulares in vitro o in vivo. De entre las técnicas presentadas, es precisamente esta última la que ha recibido una mayor atención, ya que la estructura soporte es capaz de garantizar la estabilidad y funcionalidad mecánica del implante durante el proceso de desarrollo. Son especialmente importantes las estructuras soportes fabricadas en materiales reabsorbibles que van degradándose a medida que el tejido sano va desarrollándose.

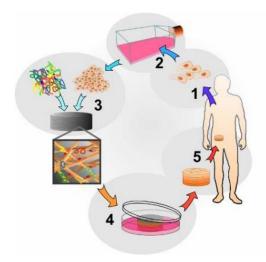


Figura 1. Esquema del proceso de autoinjertos de tejidos soportados en scaffolds.3

Para llevar a cabo un procedimiento de regeneración de tejido es posible utilizar diferentes tipos de implantes que pueden clasificarse de acuerdo a su procedencia en:

- Autoinjertos: Las células utilizadas en el trasplante proceden del propio individuo.
- Aloinjertos: Las células empleadas proceden de un individuo de la misma especie, pero diferente al paciente tratado.
- Xenoinjertos: El tejido empleado en el injerto procede de una especie diferente al receptor.

La principal ventaja de la utilización de tejido autólogo es que se evita el rechazo. Para llevar a cabo este tipo de procedimiento, es necesario realizar una biopsia de tejido sano del paciente para bien utilizarlo directamente o bien emplearlo para realizar un cultivo en una matriz soporte y ser implantados posteriormente. La utilización directa del tejido es un procedimiento en una fase y tiene como principal ventaja la reducción del número de intervenciones a las que se ve sometido el paciente. En el segundo caso, el proceso tiene lugar en dos fases clínicas: extracción de tejido sano y posterior implante.

Las principales limitaciones a la aplicación de la utilización de terapia celular autóloga es la dificultad de obtener una muestra adecuada de tejido, así como el riesgo



de morbilidad posquirúrgica. Por otra parte, no todas las líneas celulares tienen capacidad suficiente de proliferación como para garantizar el éxito de este tipo de estrategia con células diferenciadas. Como alternativa, muchos autores proponen el empleo de células madre.

Las células madre son células indiferenciadas capaces de dar lugar a diferentes tipos de líneas celulares. Su potencial en la ingeniería de tejidos es indiscutible para aprovechar las ventajas del empleo de autoinjertos. Según su procedencia, es posible clasificar las células madre en embriogénicas y adultas. Las células embriogénicas tienen ciertas limitaciones para su utilización en ingeniería de tejidos, como son las implicaciones éticas de su manipulación, así como la posibilidad de poseer potencial tumorogénico, lo que supone una limitación en términos de seguridad. Por su parte, las células madre adultas tienen una capacidad de diferenciación más limitada que las embriogénicas, si bien su pluripotencialidad continúa siendo muy amplia para el tratamiento de múltiples afecciones. Además, su obtención es más sencilla y no conlleva las implicaciones éticas inherentes a las primeras. Por estas razones, existe un interés creciente por este tipo de células madre para su utilización en la regeneración de diferentes tipos de tejido.

#### 2.2.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

A nivel económico, se prevé que el mercado de los biomateriales pase de los 62,4 mil millones de euros que generaba en 2016 a los 131,3 mil millones en 2021.<sup>5</sup> Dentro del área de los biomateriales, si bien los materiales metálicos tendrán la mayor cuota de mercado, serán los materiales poliméricos los que proporcionen una mayor tasa de crecimiento en este período. Estas cifras involucran a materiales destinados a múltiples aplicaciones biomédicas, no solo en el ámbito de la ingeniería de tejidos. En este sector, el volumen de mercado que se espera para 2022 es de 10,1 mil millones de euros.<sup>6</sup> Además, dentro de este mercado, la aplicación más importante por volumen es la ortopedia. De hecho, la cuota de este tipo de aplicaciones fue superior al 50% en 2015<sup>7</sup> y se espera que continúe liderando el sector en los próximos años, debido fundamentalmente al tratamiento de lesiones por accidente y al fenómeno de envejecimiento global. En este punto se prevé que en 2050 la población mayor de 60 años haya pasado de los 400 millones en el año 2000 a 1700 millones.8

### 2.3. FABRICACIÓN DE ESTRUCTURAS SOPORTE PARA LA REGENERACIÓN CELULAR (SCAFFOLDS)

Los scaffolds han de desarrollar un papel de mimetizar el medio extracelular para guiar y favorecer la adhesión, proliferación y migración de las células durante el proceso de regeneración tisular. Para cumplir de forma conveniente esta función, será necesario que el diseño y fabricación de los mismos cumpla con los siguientes requisitos9:

- No inducir respuesta adversa en el organismo, es decir, ser biocompatibles.
- Disponer de poros interconectados de dimensiones adecuadas para favorecer la integración y vascularización del tejido, esto es, la irrigación sanguínea en su implantación in vivo. Por lo tanto, la porosidad del scaffold afectará también a la difusión de nutrientes y gases necesarios para el proceso de respiración



- celular. Además, la distribución, estructura y tamaño de los poros influye sobre las propiedades mecánicas de la estructura a nivel macroscópico<sup>10</sup> y a la capacidad de migración de las células en el interior de la estructura.<sup>11</sup>
- Estar compuestos de materiales biodegradables y biorreabsorbibles. Los materiales biorreabsorbibles son aquellos que sufren un proceso de biodegradación mediante ataque enzimático en el que los productos de degradación no son tóxicos y pueden ser integrados en las rutas metabólicas del organismo receptor y, por tanto, evacuarse a través de las mismas.
- Tener una superficie tal que favorezca la adhesión de las células, así como su migración, proliferación y diferenciación. Para mejorar la adhesión celular puede recurrirse al empleo de ligandos bioactivos, como péptidos o polisacáridos, que pueden ser adsorbidos o injertados sobre la superficie o bien en la masa de material.<sup>12</sup>
- Poseer propiedades mecánicas adecuadas según la zona de implantación y para su manipulación. Esta característica es extremadamente importante en aquellas estructuras que pretendan implantarse en zonas sometidas a altos esfuerzos como son articulaciones y otros tejidos del aparato locomotor.
- Poderse fabricar fácilmente bajo diferentes formas y tamaños.

#### 2.3.1. TÉCNICAS DE FABRICACIÓN

Las técnicas empleadas para la fabricación de *scaffolds* han de reunir una serie de requisitos que garanticen la calidad del producto obtenido, entre las cuales es posible destacar:

- Respetar las propiedades químicas y biológicas del material, a fin de garantizar que no se altera su biocompatibilidad.
- Exactitud dimensional para reproducir el diseño anatómico necesario para cada aplicación, además de ser capaz de mantener las características de porosidad (tamaño, interconectividad, morfología, etc.) para poder garantizar regularidad en esta propiedad tan importante para el desarrollo celular.
- Repetitividad de la técnica.

Las técnicas que se han empleado tradicionalmente, entre las que destacan <sup>13</sup> la unión mediante fibras, procesos de separación de fases, *solvent casting/particulate leaching* (coagulación del material a partir de una disolución del mismo), espumado con gas/procesado a alta presión, templado con hidrocarburos, congelación en seco y combinación de las mismas, tienen una serie de desventajas que son contrarias a las características deseables antes citadas. Entre estos inconvenientes cabe destacar la excesiva dependencia del trabajo manual, la irregularidad de las características geométricas (especialmente aquellas referidas a la porosidad de la estructura), empleo de solventes tóxicos y limitaciones de diseño.

Por su parte, las técnicas de fabricación aditiva tienen la ventaja de otorgar una alta flexibilidad en el diseño, lo que es de gran interés cuando se pretenden obtener estructuras específicas para un paciente. Además, permiten un gran control de la estructura, incluso a nivel micrométrico, lo que permite optimizar la porosidad de la pieza de acuerdo a los requerimientos de la aplicación.



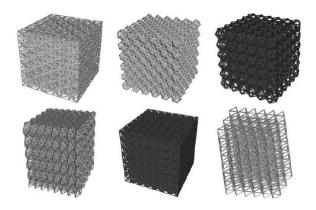


Figura 2. Ejemplos de modelos CAD para estructuras scaffold<sup>14</sup>.

#### 2.3.2. FABRICACIÓN ADITIVA EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS

La fabricación aditiva (AM, del inglés Additive Manufacturing) consiste en la elaboración de piezas funcionales mediante la deposición micrométrica de material en sucesivas capas a partir de un archivo de diseño CAD.

Para la obtención del modelo tridimensional de partida necesario para la obtención de piezas personalizadas para las necesidades de cada aplicación terapéutica pueden utilizarse dispositivos ampliamente empleados en técnicas de diagnóstico clínico, como puede ser la tomografía computerizada, que ofrece una representación 2D de la anatomía del paciente. La adecuada modelización de estas imágenes permite transformarlas en un modelo tridimensional y obtener un fichero STL a partir del cual generar la pieza.

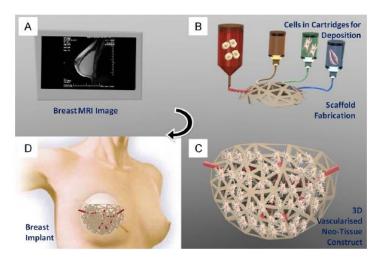


Figura 3. Esquema del proceso seguido para la fabricación de prótesis mediante fabricación aditiva. 15

El empleo de las técnicas de fabricación aditiva en medicina tiene múltiples aplicaciones, desde la obtención de biomodelos que sirvan como medio de diagnóstico o entrenamiento para operaciones complejas hasta la fabricación de útiles quirúrgicos, pasando por el diseño de implantes y estructuras soporte de diversos tipos de tejido, además de otros dispositivos médicos específicos y de pequeñas dimensiones, como pueden ser aquellos destinados a la liberación controlada de fármacos.

La fabricación aditiva ha sido empleada tanto para la obtención directa de los scaffolds como para la creación de estructuras auxiliares que actúan como moldes en



las técnicas de colada (*casting*), en los que en ciertos casos, tras la finalización del proceso, se disuelve con el disolvente apropiado<sup>16</sup>.

Con respecto al tipo de tejido en el que se utilizan las estructuras soporte fabricadas mediante fabricación aditiva, la mayor parte de la experiencia de aplicación es para tejido duro, fundamentalmente sistema locomotor, 17-19 y estructuras sólidas para el crecimiento de tejidos. En el caso de que se requiera una pieza que asemeje al tejido blando del organismo, se ha propuesto el 3D-bioplotting, que consiste en una combinación de una técnica de fabricación aditiva, como el modelado por deposición fundida, con la dispensación controlada por presión de un fluido en el seno de la matriz base<sup>16</sup>.

A continuación se presenta una breve descripción de las técnicas de fabricación aditiva más relevantes para la obtención de estructuras soporte para ingeniería tisular, así como la exposición de algunas referencias previas de su aplicación en este campo.

# 2.3.2.1. TÉCNICAS BASADAS EN PROCESOS DE FOTOPOLIMERIZACIÓN

La estereolitografía (SLA) es una técnica de fabricación aditiva que se basa en la formación de las capas de la pieza que pretende obtenerse mediante el curado de un polímero fotosensible en estado líquido por aplicación de un haz láser de radiación ultravioleta. Tras el procesado de cada capa, se hace descender la estructura soporte a fin de que exista líquido sin fotopolimerizar en la superficie.

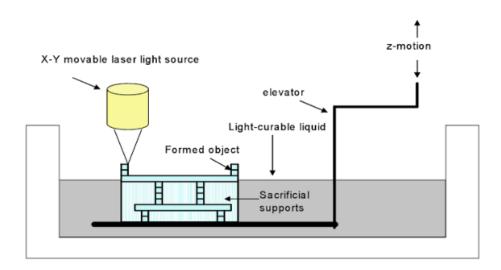


Figura 4. Esquema básico de un equipo de estereolitografía. 20

Una de las formas de aplicación más extendida de la técnica dentro del ámbito de la biomedicina ha sido la generación de moldes para la obtención de estructuras cerámicas, lo que se conoce como fabricación de sólidos de forma libre indirecta. <sup>21</sup> En este tipo de estrategia, es necesaria una etapa de calcinación del negativo obtenido por estereolitografía. La necesidad de aplicación de alta temperatura para la eliminación del molde limita, por consiguiente, la variedad de materiales que es posible utilizar a través de la aplicación de esta estrategia.



No obstante, con el objetivo de ampliar las posibilidades de la técnica dentro del campo de la ingeniería tisular, se han desarrollado materiales mediante la funcionalización de la estructura con grupos como los acrilatos y metacrilatos a través de los cuales se posibilita la fotopolimerización.<sup>22</sup> Con esta técnica se han evaluado materiales como el carbonato de trimetileno, la policaprolactona, el polilactato o el poli (propilenfumarato)<sup>23</sup>. A modo de ejemplo, Elomaa y colaboradores han desarrollado una metodología para poder llevar a cabo la fotopolimerización de la policaprolactona sin necesidad de utilizar disolventes adicionales. Con este proceso han construido scaffolds con una porosidad del 70,5% y un tamaño medio de poro de 465 µm.<sup>24</sup>

## 2.3.2.2. TÉCNICAS BASADAS EN SINTERIZADO LÁSER

En el sinterizado láser (SLS), se dispone de un lecho de material polimérico en polvo a una temperatura ligeramente inferior a su punto de fusión. La incidencia de un láser de dióxido de carbono es capaz de incrementar localmente la temperatura hasta fundir el material. De esta manera, la fusión entre partículas adyacentes de material permite definir patrones con una gran exactitud dimensional.

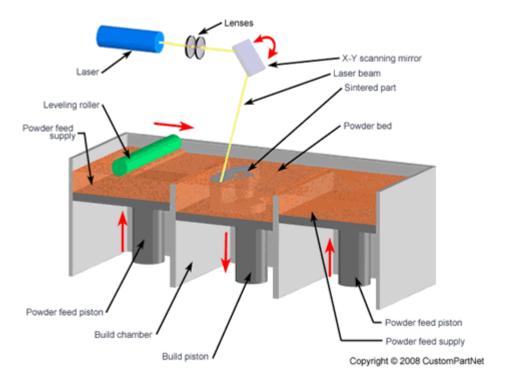


Figura 5. Esquema básico de un equipo de sinterizado láser.

Una vez se finaliza la definición de una capa, un rodillo adiciona otra capa de material en polvo aplicando una ligera presión a fin de conseguir una buena compactación entre capas. Esta acción va acompañada de un descenso de la estructura soporte del lecho de material sólido en una cantidad igual al espesor de la capa añadida por el rodillo a fin de repetir el proceso de sinterizado por acción del láser. La cantidad de materiales que es posible tratar con técnicas de sinterizado láser es significativamente superior a la correspondiente a la estereolitografía, puesto que teóricamente cualquier material que funda pero no sufra descomposición bajo la



incidencia del haz puede ser procesado de esta forma. En el ámbito de materiales con aplicación biomédica, es posible mencionar ejemplos en la bibliografía de utilización de la técnica tanto para materiales poliméricos, como la policaprolactona, biovidrios, en metales de materiales cerámicos basados en hidroxiapatita o materiales metálicos, como el titanio; lo que demuestra su versatilidad en cuanto al tipo de materiales que es posible procesar.

Para la fabricación de estructuras soporte para la regeneración, la principal ventaja de las técnicas basadas en el sinterizado láser es que la microporosidad obtenida en las piezas como consecuencia de la fusión localizada de material durante el proceso de fabricación favorece la adhesión celular, que puede verse aún más incrementada mediante tratamientos posteriores de la estructura, como es el recubrimiento de la estructura con polímeros naturales. En esta línea, Chen et al. han realizado estudios sobre la idoneidad de realizar el postratamiento de *scaffolds* de policaprolactona obtenidos mediante sinterizado láser con colágeno para su aplicación en la regeneración de tejido cartilaginoso.<sup>29</sup>

# 2.3.2.3. TÉCNICAS BASADAS EN PROCESOS DE EXTRUSIÓN

En este conjunto de técnicas se deposita material en forma de filamento sobre una plataforma. La deposición sucesiva de capas va generando la geometría de la pieza. El desplazamiento de la boquilla en los ejes X-Y del plano de deposición del material se controla de forma similar a como se efectúa en una máquina CNC y viene definido por el correspondiente archivo CAM que representa la geometría de la pieza.

En el interior del cilindro de extrusión que alberga el material, éste puede estar disuelto o a una temperatura próxima a su punto de fusión. En el primer caso, la adhesión entre capas se consigue al evaporarse el disolvente o mediante interacción química sobre el sustrato en que se efectúe la deposición. En el segundo caso, las capas se unen gracias a la solidificación del material y se engloban de forma estandarizada en la ISO/ASTM 52900:2015. Por consiguiente, las técnicas de fabricación aditivas basadas en procesos de extrusión son adecuadas tanto para la fabricación de piezas realizadas en materiales termoplásticos como son el ácido poliláctico, la policaprolactona o el ácido poliglicólico; como para la obtención de estructuras basadas en hidrogeles. Estos últimos tienen una gran relevancia cuando se pretende incorporar en el proceso de fabricación células o compuestos biológicamente activos.

El proceso de fabricación aditiva basado en la extrusión de material más ampliamente utilizado es el modelo por deposición fundida (FDM, de sus siglas en inglés, Fused Deposition Modelling). En este proceso, la extrusión del material se consigue mediante su calentamiento y la alimentación al cilindro de extrusión se efectúa en forma de hilo.

El modelado por deposición fundida se ha utilizado para la fabricación de *scaffolds* con biomateriales como la policaprolactona. De hecho, la técnica ha sido ampliamente estudiada para su utilización con policaprolactona con amplitud de canal entre 260 y 370 µm y porosidades entre 48-77%. A nivel comercial se pueden citar ejemplos como los modelos comerciales OsteoplugTM y OsteomeshTM de la empresa Osteopore, que ya han sido probados a nivel clínico en cirugía craneal y ocular. Osteopore





Figura 6. Scaffold de PCL Osteoplug™ e implantación quirúrgica del mismo.

No obstante, las máquinas de FDM comerciales requieren la alimentación de material en forma de hilo, operación compleja para una gran cantidad de los materiales empleados en la fabricación de scaffolds, puesto que son fácilmente biodegradables y su procesabilidad no es tan versátil como la de los termoplásticos habitualmente empleados en el modelado por deposición fundida. Por ello, han surgido modificaciones del proceso, como son la técnica de deposición de fibra 3D o la deposición por extrusión precisa (PED, de sus siglas en inglés Precision Extruding Deposition). Esta técnica presenta la ventaja de proporcionar una gran exactitud a una escala de trabajo micrométrica, pudiéndose obtener estructuras de forma repetitiva y un gran grado de interconectividad de poros, tal como demuestran los estudios realizados por Shor y colaboradores.31

Sin embargo, la aplicación de temperatura elevada durante el proceso de extrusión puede provocar la degradación parcial del termoplástico (de carácter biodegradable) y hace inviable la introducción en la formulación de multitud de polímeros naturales y factores de crecimiento que no pueden procesarse a alta temperatura. Por ello se han propuesto procesos basados en la extrusión de una disolución de material, como puede ser el PAM232 o aquellos que se basan en la deposición en condiciones de baja temperatura para asegurar la solidificación de material. 11

En esta tesis se ha estudiado la introducción de materiales complejos en técnicas de fabricación aditiva basadas en extrusión. Este proceso es el que admite una mayor versatilidad en cuanto a la variedad de materiales empleados.

#### 2.4. REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO

Como se comentó anteriormente se prevé que en 2050 la población mayor de 60 sea de 1700 millones de personas, 8 lo que da una idea de la necesidad de mejorar las alternativas terapéuticas de todas aquellas patologías que afectan especialmente a este segmento de la población. Este envejecimiento global es uno de los principales factores que afectan al creciente interés por el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas del sistema locomotor, entre las que se encuentran aquellas relacionadas con la ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos en el tratamiento de lesiones de tejido óseo tiene su mayor campo de aplicación en la regeneración de grandes defectos originados por la extirpación de neoplasias o por traumas.



En este punto, se hace necesario realizar una descripción breve de las principales características del tejido óseo a fin de comprender las principales exigencias que deben cumplir las estructuras que pretendan ser utilizadas en la regeneración de este tipo de tejido.

## 2.4.1. ESTRUCTURA DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es un tejido de tipo conectivo que tiene una funcionalidad básica de soporte, locomoción y protección del organismo de cualquier vertebrado. Además, el hueso tiene diversas funciones de homeostasis mineral (especialmente calcio y fósforo), producción de células sanguíneas en la médula roja (hematopoyesis) y almacén de grasas de reserva en la médula amarilla.

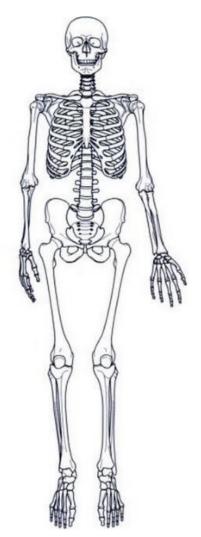


Figura 7. Esqueleto humano. 33

A nivel estructural, el hueso se compone de un bajo contenido de componente celular embebido en la matriz ósea. Esta matriz presenta un comportamiento mecánico diferente según la dirección de aplicación de la carga, es decir, se trata de una sustancia anisotrópica. La matriz extracelular está compuesta de una fase mineral y una fase orgánica.



#### 2.4.1.1. MATRIZ ÓSEA

Con respecto a la fase orgánica, se compone de proteínas que pueden clasificarse entre el colágeno y proteínas no colágenas. Esta clasificación se debe a que el colágeno es el componente mayoritario de esta fase. Esta proteína otorga resistencia a la tracción a la estructura. En concreto, el 90% del colágeno es de tipo I, que está formado por dos cadenas alfa I y una cadena alfa II. Las moléculas de colágeno se asocian en fibras que pueden orientarse de forma no laminar (fibras entrecruzadas), laminar (fibras paralelas) o laminar concéntrica (fibras paralelas con distribución concéntrica).

El resto de proteínas presentes en el tejido óseo (factores de crecimiento como las proteínas morfogenéticas BMP-2, osteocalcina y osteonectina) fundamentalmente funciones reguladoras.

La fase mineral del hueso está compuesta principalmente de cristales de hidroxiapatita de entre 20 y 80 nm de longitud y de 2 a 5 nm de grosor. 34 Esta fase es la principal responsable de la resistencia a la compresión del hueso. La presencia de impurezas, como carbonatos o hidróxido de magnesio, modifican las propiedades de este mineral frente a su equivalente sintético y juegan un papel fundamental en el proceso de remodelación ósea.35

Existe una distribución organizada de las fases mineral y orgánica, de tal forma que la primera refuerza a nivel mecánico a la segunda. Esta nanoarquitectura de la matriz extracelular es la clave de la resistencia mecánica del tejido óseo.

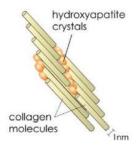


Figura 8. Organización de la matriz extracelular. 36

## 2.4.1.2. CÉLULAS ÓSEAS

El hueso está formado por cuatro tipos de células: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteoclastos y osteocitos (Figura 9).

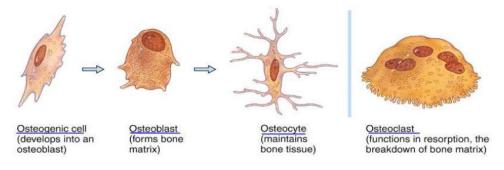


Figura 9. Esquema de las diferentes células óseas.



## Células osteoprogenitoras

Se trata de células indiferenciadas con carácter de fibroblastos. Durante el proceso de diferenciación pueden dar lugar a tres tipos de células, además de osteoblastos: adipositos, condroblastos y fibroblastos.<sup>37</sup>

#### **Osteoblastos**

Los osteoblastos son las células encargadas de la formación de la matriz ósea que posteriormente será mineralizada. Son capaces de segregar el colágeno I que forma gran parte de la matriz, así como proteínas no colágenas, tales como los proteoglicanos o fosfoproteínas, entre otros. Debido a esta funcionalidad secretora, poseen un aparato de Golgi y un retículo endoplasmático muy desarrollados.

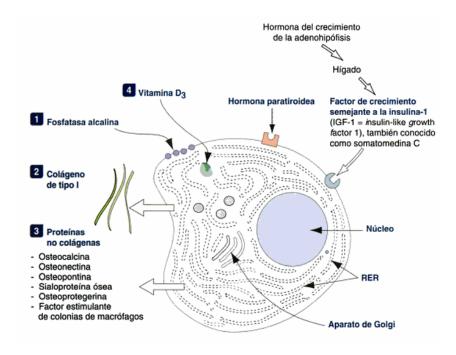


Figura 10. Características básicas del osteoblasto.<sup>38</sup>

#### **Osteocitos**

Los osteocitos se forman a partir de los osteoblastos cuando estos se encuentran rodeados de matriz mineralizada, si bien solo una fracción de osteoblastos se transforma en osteocitos. Poseen multitud de prolongaciones del citoplasma que les permiten establecer conexiones no solo con otros osteocitos, sino también con osteoblastos.

Los osteocitos regulan el proceso de remodelación ósea, dado que son capaces de funcionar como sensores de los esfuerzos mecánicos a los que se encuentra sometido el hueso y coordinar la formación de hueso según las necesidades a las que se ve sometido el tejido. No obstante, el mecanismo exacto según el cual son capaces de regular este proceso continúa sin haber sido completamente establecido, si bien se han propuesto tres tipos de estímulos como señales fundamentales en la detección de las cargas mecánicas: la deformación de la matriz ósea, el flujo inducido por la carga



del fluido canicular y los potenciales eléctricos generados como consecuencia de este flujo.39

#### Osteoclastos

La principal función de los osteoclastos es la resorción de la matriz a lo largo del continuo proceso de remodelado del tejido óseo. Este proceso se lleva a cabo mediante la secreción de proteasas capaces de hidrolizar las proteínas que conforman la matriz. Se trata de células multinucleadas que se ubican en cavidades de la superficie ósea denominadas lagunas de Howship y poseen abundantes lisosomas.

#### 2.4.2. TIPOS DE TEJIDO ÓSEO

Por sus diferencias en cuanto a funcionalidad biológica y estructura, es posible clasificar el tejido óseo en dos grandes grupos: hueso cortical y hueso esponjoso (o trabecular). El esqueleto humano se compone, aproximadamente, de un 80% de hueso cortical y un 20% de hueso trabecular. 40

El hueso cortical tiene entre el 80-90% de su volumen mineralizado<sup>41</sup> y forma parte de la zona externa de los huesos, proporcionando sostén y rigidez. A nivel mecánico, tiene carácter anisotrópico (Tabla 1), lo que se justifica cuando se observa la morfología del tejido, cuya unidad estructural es la osteona o sistema de Havers (detalle en Figura 11), que son sistemas cilíndricos definidos por la agrupación de laminillas concéntricas. La osteona dispone de un conducto central o de Havers por el que discurren los vasos sanguíneos, linfáticos y los nervios. Estos canales se conectan transversalmente a través de los canales de Volkman.

Compresión	Resistencia	167-213 MPa
	Módulo de Young	14,7-34,3 GPa
Tracción	Resistencia	107-170 MPa
	Módulo de Young	11,4-29,2 GPa
Flexión	Resistencia	103-238 MPa
	Módulo de Young	9,8-15,7 GPa
Torsión	Resistencia	65-71 MPa
	Módulo de Young	3,1-3,7 GPa

Tabla 1. Propiedades mecánicas del hueso cortical humano bajo diferentes tipos de carga. 42

Por su parte, el hueso trabecular es mucho más poroso, ya que contiene una gran cantidad de cavidades vasculares que ocupan los vasos sanguíneos y elementos hematopoyéticos. Estas cavidades se encuentran delimitadas por las trabéculas: prolongaciones óseas entrecruzadas que pueden ser laminares o no laminares según la disposición que adquieren las fibras de colágeno. La distribución de las trabéculas depende de las necesidades de carga mecánica a la que se encuentra sometido el tejido según su funcionalidad en el sistema locomotor.



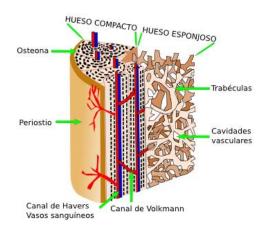


Figura 11. Esquema de distribución del tipo de tejido óseo en un hueso largo. 43

En cuanto a sus propiedades mecánicas, la alta porosidad de este tipo de tejido óseo hace que la rigidez sea menor que en el caso del hueso cortical. Además, sus propiedades mecánicas son altamente dependientes de la densidad ósea, existiendo en la bibliografía múltiples estudios que analizan la modelización de una ecuación que relacione ambos parámetros. 44-46

Por último, cabe destacar que, a pesar de que, tal como se mencionó anteriormente, la mayor parte del tejido óseo es de tipo cortical, la mayor relación superficie/masa disponible en el hueso trabecular es uno de los parámetros que posibilitan que sea en este tipo de tejido donde se produzcan los fenómenos de remodelación ósea.

#### 2.4.3. LA INGENIERÍA DE TEJIDOS EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO

El hueso es el tejido del que se realizan más trasplantes después de la sangre. <sup>47</sup> Sin embargo, a pesar de la experiencia de la que se dispone en el tratamiento de lesiones óseas a través de trasplantes, existen todavía muchas limitaciones para que la regeneración ósea sea un tratamiento eficaz de un gran número de patologías del sistema óseo. Actualmente, el tipo de injertos más utilizado es el autoinjerto. Sin embargo, tal como se mencionó en los primeros apartados del presente capítulo, este tipo de injerto tiene como principales inconvenientes la limitación en el suministro de tejido, riesgo de morbilidad del sitio donante y la necesidad de una segunda cirugía en el caso de que el procedimiento sea realizado en dos fases. Por su parte, los aloinjertos son otra alternativa que se usa de forma relativamente frecuente, si bien el riesgo de rechazo aumenta considerablemente, así como la posibilidad de infección.

Para el tratamiento de grandes defectos óseos es muy práctica la utilización de prótesis e implantes metálicos, especialmente titanio. Sin embargo, este tipo de materiales no son biodegradables y tienen unas propiedades mecánicas superiores a las del tejido original, lo que puede originar problemas de integración con el tejido circundante.

Por estas razones, ha ido cobrando relevancia el desarrollo de *scaffolds* biorreabsorbibles que sirvan como soporte temporal para el desarrollo de tejido propio que paulatinamente sustituya a la estructura implantada. Los implantes pueden ser acelulares si no incluyen en su interior o superficie células. En este caso, el implante



supone un soporte mecánico que suplirá las necesidades del tejido ausente hasta que el tejido circundante sea capaz de colonizar la estructura. Alternativamente, es posible introducir células en la estructura como paso previo a su implantación in vivo. Las células más interesantes para llevar a cabo esta estrategia son las células madre adultas, que pueden ser extraídas del tejido adiposo o de la médula ósea, principalmente.

Tanto en las estructuras acelulares como en las celulares, es frecuente la introducción de sustancias que favorezcan la proliferación celular en la superficie del andamio, de factores de crecimiento que faciliten la diferenciación de las células madres en osteoblastos (como son las proteínas morfogenéticas óseas BMP-2) o de fármacos coadyuvantes del tratamiento, como son quimioterápicos o antibióticos. 48

Los andamios celulares utilizados en la regeneración de tejido óseo pueden fabricarse mediante diversas técnicas, entre las que se encuentran el electrospinning, la liofilización o la fabricación aditiva.

El electrospinning o electrohilado proporciona fibras a escala micro o nanométrica mediante la aplicación de un campo eléctrico sobre una disolución del polímero con el que se está trabajando (Figura 12).

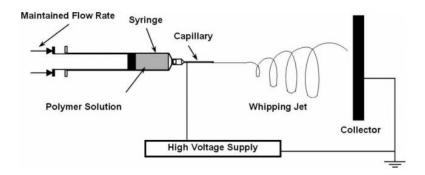


Figura 12. Esquema del proceso de electrospinning. 49

Con esta técnica es posible obtener una malla porosa capaz de proporcionar un entramado capaz de mimetizar la matriz extracelular biológica en base colágeno. Además, mediante el empleo del electrohilado coaxial, es posible obtener fibras híbridas de diferentes materiales con la finalidad de aprovechar las propiedades complementarias de diferentes sustancias. 49 Sin embargo, el electrospinning no permite tener un control riguroso de la geometría o la porosidad de las estructuras y, además, los valores de tamaño de poro que se obtienen son excesivamente bajos para permitir una adecuada infiltración celular hacia el interior de la estructura.50

Algunos de los materiales sugeridos en la bibliografía para obtener scaffolds apropiados para la regeneración de tejido óseo obtenidos a través de electrospinning son las fibras de quitosano-nanohidroxiapatita<sup>51</sup>, de policaprolactona-gelatina<sup>52</sup> o hidroxiapatita-ácido poliláctico<sup>53</sup>, entre otros. Además de para la obtención de estructuras porosas poliméricas, el electrospinning puede emplearse también para obtener precursores combinados de materiales poliméricos y cerámicos para, posteriormente, eliminar la fase polimérica y sinterizar la cerámica mediante aplicación de alta temperatura. 54



En los procesos de liofilización, el material es disuelto en un medio adecuado que posteriormente sufrirá un proceso de sublimación, con lo que se consigue obtener numerosos poros interconectados. La ventaja de la técnica es la posibilidad de trabajar con bajas temperaturas que permitan preservar la actividad biológica de factores de crecimiento u otras sustancias bioactivas que deseen incorporarse a la matriz. Algunos ejemplos de procedimientos de obtención de andamios celulares para la regeneración de hueso mediante técnicas de liofilización son el propuesto por Serra et al. Para la obtención de estructuras composites quitosano-gelatina-BTCP o el propuesto por Vahabi et al. An el que la técnica es utilizada para introducir en la formulación factores de crecimiento (TGF-β1 y PDGF-βB) para favorecer los procesos de diferenciación celular. Sin embargo, una de las principales limitaciones del empleo de la liofilización es que los poros obtenidos son irregulares y de un tamaño insuficiente (15-35 μm) para garantizar la adecuada proliferación de las células involucradas en el proceso de regeneración del hueso.

Otra alternativa es la combinación de *solvent-casting* y la lixiviación de partículas, que consiste en trabajar con una disolución polimérica a la que se añaden partículas de sal distribuidas de forma uniforme. El disolvente se elimina mediante evaporación para a continuación disolver las partículas de sal con agua, lo que da lugar a una estructura porosa que puede ser utilizada para soportar el crecimiento celular. Además de sales como el cloruro de sodio<sup>57</sup>, es posible utilizar otras partículas para la generación de los poros, como son la sacarosa o la gelatina<sup>58</sup>. A pesar de la simplicidad de la técnica, una de las principales desventajas es la dificultad de poder obtener geometrías macroscópicas complejas, además de la posibilidad de que existan residuos de los disolventes tóxicos empleados durante el proceso en la estructura final.

El empleo de las técnicas de fabricación aditiva ofrece una forma de solucionar las limitaciones de diseño que presentan las técnicas anteriores, pudiéndose obtener implantes que se ajusten de manera precisa a las necesidades anatómicas de la lesión a tratar. Además, muchas de las técnicas de fabricación aditiva no requieren el empleo de disolventes orgánicos o coadyuvantes del proceso que puedan afectar a la biocompatibilidad de la estructura final. La introducción de este tipo de técnicas en la regeneración de tejido óseo en los últimos años ha sido muy relevante y, por ello, se presenta una revisión más exhaustiva de los materiales que se han probado en esta aplicación en la siguiente sección (2.5. Materiales empleados en la regeneración de tejido óseo).

Por otra parte, es importante tener en consideración que la estructura heterogénea del hueso provoca que sea necesario analizar alternativas que permitan obtener estructuras estratificadas, con gradientes o multicapa que sean capaces de mimetizar el tejido original.



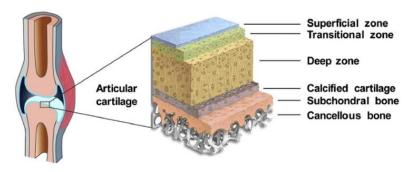


Figura 13. Estratificación de tejidos en unidades osteocondrales.<sup>59</sup>

Este aspecto es fundamental en el tratamiento de lesiones osteocondrales en el que se ven involucrados tanto tejido cartilaginoso como hueso subcondral (Figura 13). Para obtener las estructuras heterogéneas que mimeticen las diferentes capas de tejido involucradas en este tipo de lesiones (Figura 14), pueden emplearse diferentes técnicas de fabricación para cada una de las capas o regiones. Un ejemplo de esta aproximación en estructuras bicapa es la combinación alginato-ácido poli (láctico-co-glicólico)<sup>60</sup>. Otra opción es utilizar el mismo método de fabricación modificando los parámetros de diseño, de operación o el material empleado. Un ejemplo de esta última alternativa es la propuesta realizada por Di Luca y colaboradores <sup>61</sup> quienes proponen utilizar la fabricación aditiva para la obtención de *scaffolds* para la regeneración de lesiones osteocondrales y guiar la diferenciación celular hacia líneas osteogénicas o condrogénicas según el diseño del poro utilizado a lo largo de la estructura.



Figura 14. Esquema de estructura multicapa de un scaffold para regeneración de lesiones osteocondrales. 62

# 2.5. MATERIALES EMPLEADOS EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO

En la fabricación de estructuras para la regeneración de tejido óseo se han empleado tanto materiales metálicos, como cerámicos o poliméricos, así como combinaciones de los mismos, especialmente formulaciones híbridas de los dos últimos grupos.

Para realizar la descripción de los materiales que se emplean en la regeneración ósea, es conveniente definir dos características relevantes de los materiales con potencial para esta aplicación, como son la osteoinducción y la osteoconducción. La osteoinducción es la capacidad del material soporte para favorecer los procesos de diferenciación celular cuando se cultivan células pluripotenciales, como son las células mesenquimales. Por su parte, la osteoconducción es el proceso mediante el cual se produce el crecimiento de tejido vascular y la colonización del tejido circundante



desde la zona receptora hacia el injerto. Esta capacidad de permitir la integración del tejido y su vascularización es fundamental para garantizar el crecimiento de hueso nuevo de acuerdo con el patrón definido por la estructura soporte.

## 2.5.1. MATERIALES METÁLICOS

Los materiales metálicos, especialmente aleaciones derivadas del titanio como son el Ti6Al4V, han sido utilizados muy ampliamente en la fabricación de prótesis dentales y óseas. 63-65 Sin embargo, los implantes macizos del titanio y sus principales aleaciones tiene unas propiedades mecánicas demasiado elevadas que provocan un desfase con el tejido circundante para su aplicación en el tratamiento de lesiones óseas. Este desfase influye negativamente sobre la integración de las prótesis en base titanio dando lugar a un proceso de desajuste conocido como *stress shielding effect*. 66,67

La utilización de técnicas de fabricación aditiva con este tipo de materiales permite obtener estructuras porosas que reducen el módulo elástico de tal forma que pueden obtenerse unos parámetros más similares al hueso. En este sentido, las tecnologías más ampliamente utilizadas para la obtención de estructuras porosas en base titanio son las basadas en procesos de sinterizado, como la EBM<sup>67</sup> (*Electron Beam Melting*) o la SLM<sup>68</sup> (*Selective Laser Melting*). Recientemente, se ha propuesto la introducción de nanohidroxiapatita como aditivo de estas aleaciones a fin de obtener estructuras potencialmente más bioactivas que las habituales aleaciones metálicas de base titanio. <sup>69</sup> A modo de ejemplo, Han et al. <sup>70</sup> estudiaron el efecto de las partículas cerámicas en la estructura interna del material metálico durante el proceso de sinterizado.

A pesar de su utilidad como material de fabricación de prótesis dentales y óseas, las estructuras metálicas no son biodegradables y presentan una superficie que no favorece el desarrollo tisular, ya que se trata de materiales bioinertes. Por esta razón, se han propuesto diversas modificaciones superficiales sobre las superficies de titanio, como son la utilización de recubrimientos con hidroxiapatita o quitosano, entre otras sustancias bioactivas capaces de mejorar la proliferación celular en la superficie de las estructuras metálicas. Los recubrimientos con hidroxiapatita se logran a través de procedimientos electroquímicos, como es la deposición electroforética. Por su parte, la obtención de los recubrimientos poliméricos, como son el quitosano o el alginato, se realizan mediante la preactivación de la superficie de titanio mediante la oxidación con ácidos y/o sustancias oxidantes capaces de formar grupos oxigenados en la superficie del titanio que servirán como puntos de anclaje para llevar a cabo el recubrimiento con sustancias poliméricas de mayor bioafinidad que el material soporte metálico. 72

Por otra parte, la utilización de estructuras metálicas presenta un inconveniente adicional para los casos pediátricos, en los que el aparato locomotor se encuentra aún en fase de crecimiento. En estas situaciones, la utilización de posteriores fases quirúrgicas se hace obligatoria para retirar los soportes que con el paso del tiempo ya no son adecuados a la anatomía de los pacientes. Para estos casos se hace especialmente interesante la utilización de implantes reabsorbibles.



# 2.5.2. MATERIALES CERÁMICOS

Aproximadamente el 65% de la masa ósea está compuesta por hidroxiapatita.<sup>73</sup> Por esta razón, la utilización de este material ha sido amplia en la regeneración de tejido óseo<sup>74</sup> y fue una de las primeras sustancias propuestas para esta aplicación. La hidroxiapatita presenta una adecuada integración, así como capacidad osteoinductora, 73 lo que la hace muy interesante para la aplicación de terapias celulares con células pluripotenciales. Además de la hidroxiapatita, se han propuesto otros materiales cerámicos como soportes de la regeneración de tejido óseo, entre los que destacan otras fases cristalinas de los fosfatos de calcio, así como los biovidrios.

Los B-TCP (fosfato de tri-calcio) son fases cristalinas con una relación Ca:P de 1,5,73 inferior al valor de 1,67 característico de la hidroxiapatita. Los B-TCP tienen una mayor velocidad de reabsorción que la hidroxiapatita y, además, existen estudios que señalan una mayor bioactividad inicial.

Por su parte, los biovidrios son un tipo de materiales que contienen SiO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>O, CaO y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. The Los biovidrios tienen una elevada bioactividad, considerada la más alta *in vivo*<sup>75</sup> de entre los materiales cerámicos empleados en ingeniería de tejido óseo. De hecho, el biovidrio 4S5S Bioglass® de Larry Hench fue el primer material sintético que demostró ser capaz de interaccionar químicamente con el hueso.<sup>76</sup> Sin embargo, tienen unas propiedades mecánicas insuficientes, lo que limita su potencial como material soporte.

A pesar de que los materiales cerámicos tienen mayores dificultades de procesabilidad que los metales o los polímeros, éstos también pueden ser procesados mediante técnicas de fabricación aditiva. En apartados anteriores se mencionó la alternativa de obtener estructuras cerámicas a partir de la utilización de un molde negativo obtenido por estereolitografía. Sin embargo, también es posible utilizar esta técnica de forma directa para la obtención de scaffolds cerámicos. 77,78 A modo de ejemplo, Seol et al.<sup>79</sup> proponen un método basado en microestereolitografía. Dado que los componentes cerámicos no son fotopolimerizables, para poder llevar a cabo este tipo de procesado, los autores utilizaron una resina fotocurable (FA1260T) para obtener una pasta composite que pueda ser procesada mediante esta técnica. La estructura de resina y cerámica se sinteriza posteriormente de tal forma que se obtiene una estructura puramente cerámica. A continuación, esta estructura se infiltra con una disolución polimérica para la mejora de las propiedades mecánicas. Sin embargo, este tipo de aproximación tiene varias limitaciones, como son el incremento de la viscosidad de la resina fotopolimerizable que implica la introducción de partículas de material cerámico o la interferencia de las mismas con la radiación incidente.<sup>77</sup>

Una alternativa similar la proponen Zhao y colaboradores<sup>80</sup> para lograr la extrusión en bioplotter de estructuras de base biovidrio. Estos autores consiguen obtener una suspensión de procesabilidad adecuada para su extrusión que consiste en una mezcla del biovidrio, etanol, agua y metilcelulosa. Los restos de metilcelulosa son eliminados posteriormente mediante descomposición térmica a 300°C.

Otra alternativa para la fabricación de estructuras tridimensionales con materiales cerámicos es el sinterizado láser. A pesar de la viabilidad de obtener



estructuras sinterizadas de un único material cerámico, diversos autores han explorado las ventajas de la combinación de los biovidrios con las diferentes variedades de fosfato de calcio habitualmente empleadas en ingeniería tisular a fin de aprovechar las ventajas de ambos tipos de materiales. En este sentido, Shuai et al.<sup>81</sup> obtuvieron estructuras sinterizadas de biovidrio 63s dopadas con nanohidroxiapatita. La hidroxiapatita introduce un efecto de refuerzo con respecto a la estructura sin aditivar siempre y cuando la cantidad de refuerzo cerámico se mantenga por debajo del 10%. Para valores superiores, las partículas de nanohidroxiapatita tienden a aglomerarse eliminándose el efecto de refuerzo. Por su parte, la introducción de biovidrio nano-58s como aditivo en matriz de B-TCP propuesta por Liu et al.<sup>82</sup> mejora la capacidad de formación de apatita sobre la superficie de *scaffolds* obtenidos mediante sinterizado láser, así como su afinidad celular.

Debido a las ya mencionadas dificultades de procesabilidad, así como las limitadas propiedades mecánicas que ofrecen las estructuras cerámicas, existen estudios en los que se propone su combinación con cierta cantidad de material polimérico capaz de mejorar la resistencia de las mismas.

Algunos ejemplos de la aplicación de esta estrategia son el trabajo de Shuai y colaboradores, quienes introdujeron en el material base (B-TCP) una pequeña cantidad de ácido polifactico que proporciona una fase líquida transitoria que desparece con la degradación de este material polimérico durante el sinterizado. También existen trabajos en este sentido de la combinación de estructuras de fosfato de calcio con recubrimientos e incorporación de policaprolactona en las barras de piezas sinterizadas. 84

#### 2.5.3. MATERIALES POLIMÉRICOS

Los materiales cerámicos son excesivamente frágiles para soportar los esfuerzos mecánicos a que se verán sometidos los injertos de este tipo de tejido. Por ello, se recurre al empleo de polímeros, ya sea de origen natural, como el colágeno o el chitosán, o sintéticos, como el ácido glicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA), los copolímeros de estos dos (PLGA), la policaprolactona (PCL) y ciertos poliuretanos. Estos polímeros son reabsorbibles y por tanto, la principal ventaja de su utilización es la eliminación de procesos quirúrgicos posteriores que tengan como finalidad la retirada de las estructuras soporte. En la Figura 15 se enumeran los principales materiales empleados en la regeneración de tejido óseo mediante técnicas de ingeniería de tejidos. En el presente apartado se realizará una breve descripción de las principales características de cada uno de ellos, así como la presentación de algunas referencias que ejemplifican cómo han sido empleados en el estado del arte.



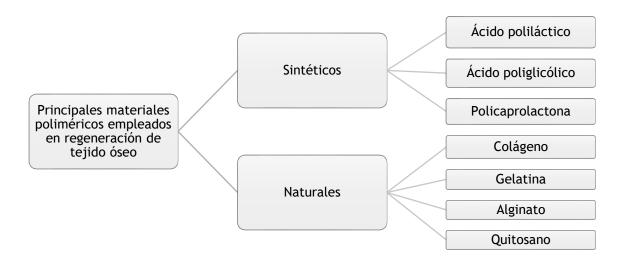


Figura 15. Esquema de los principales materiales poliméricos empleados en la fabricación de estructuras para la regeneración de tejido óseo.

Cuando se emplean materiales reabsorbibles es importante que la velocidad de crecimiento celular sea aproximadamente igual a la velocidad de degradación del material soporte a fin de que el tejido propio vaya sustituyendo a un ritmo adecuado al injerto, ya que una degradación excesivamente rápida implica una pérdida en las propiedades mecánicas de la zona regenerada, mientras que un proceso demasiado lento dificulta un adecuado crecimiento celular.

Por otra parte, existen multitud de materiales compuestos o composites que aprovechan ventajas de diferentes materiales, especialmente mezclas de polímeros y materiales cerámicos (una de las más comunes es la policaprolactona con hidroxiapatita), si bien también es habitual realizar mezclas de polímeros que ofrezcan propiedades complementarias, bien desde el punto de vista de funcionalidad biológica o para su procesado.

En el ámbito de los biomateriales de naturaleza polimérica destacan los hidrogeles, matrices tridimensionales poliméricas que son capaces de retener una cantidad de agua, lo que los hace muy interesantes para la simulación de tejidos biológicos 85 y para la liberación de fármacos. De hecho, el entorno proporcionado por los hidrogeles los hace adecuados para la incorporación de células en el medio, de manera que es posible llevar a cabo el proceso de impresión con las células contenidas en el interior del hidrogel, con las consiguientes ventajas para el control de la proliferación en sitios específicos. Este tipo de estrategia se conoce como bioprinting o bioimpresión. Algunos de los polímeros más empleados en la formulación de hidrogeles son el alginato de sodio, la gelatina, el colágeno, el quitosano, la fibrina y el ácido hialurónico.86

Sin embargo, a pesar de sus adecuadas características desde el punto de vista de biocompatibilidad y su capacidad de proporcionar un ambiente favorable para el



desarrollo celular, la aplicación de este tipo de estructuras en la regeneración ósea está limitada por su insuficiente rigidez mecánica. En este sentido, cabe destacar la amplia labor de investigación enfocada a la búsqueda de diferentes sistemas de reticulación capaces de incrementar la resistencia mecánica de los hidrogeles manteniendo su citocompatibilidad. También los estudios se han centrado en el desarrollo de hidrogeles aditivados para mejorar la integridad de la estructura así como sus propiedades mecánicas. En este sentido, Wang y colaboradores obtuvieron estructuras impresas de alginato-gelatina-nanohidroxiapatita y demostraron que la presencia de la nanohidroxiapatita en estos soportes tiene un papel relevante en los procesos de diferenciación osteogénica, lo que le otorga un potencial interesante para su aplicación en los procesos de regeneración ósea.

# 2.5.3.1. MATERIALES POLIMÉRICOS SINTÉTICOS

Los polímeros sintéticos más ampliamente empleados en ingeniería de tejidos son los poliésteres como el ácido poliglicólico, el ácido poliláctico y la policaprolactona. Debido a su estructura, este tipo de polímeros pueden ser biodegradados *in vivo*. Además, los subproductos de degradación pueden ser reabsorbidos por rutas metabólicas. Esta característica, unida a su procesabilidad mediante diferentes técnicas (incluyendo la fabricación aditiva) y el hecho de proporcionar unas propiedades mecánicas relativamente buenas son las principales ventajas de este tipo de polímeros sintéticos para la aplicación abordada en este trabajo. Por su parte, la principal desventaja es su baja afinidad celular, lo que dificulta la colonización de las estructuras, especialmente en fases tempranas tras la implantación.

El ácido poliláctico (PLA) es un poliéster alifático sintético biodegradable obtenido por la polimeración del ácido láctico. Se trata de un polímero de alta resistencia mecánica, biocompatible y de una adecuada procesabilidad del que existen multitud de referencias en términos de su potencial para la fabricación de estructuras con aplicaciones en regeneración ósea.

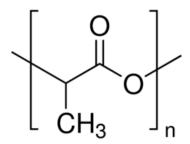


Figura 16. Estructura química del ácido poliláctico.

Técnica de fabricación empleada	Referencia
Electrospinning	89
Fabricación aditiva	90,91
Lixiviación con sales	92

Tabla 2. Relación de técnicas de fabricación que han sido empleadas en la obtención de estructuras soporte en base ácido poliláctico.



No obstante, una de las principales limitaciones de este material es que la acumulación de sus subproductos de degradación, de naturaleza ácida, puede provocar fenómenos de inflamación en el tejido circundante.

El ácido poliglicólico (Figura 17) tiene unas propiedades mecánicas menores a los otros dos polímeros sintéticos citados anteriormente, razón por la cual su uso en regeneración ósea es limitado. No obstante, es interesante su copolímero con el ácido poliláctico (PLGA), puesto que se obtiene un material con una velocidad de degradación acelerada con respecto al PLA puro, lo cual es interesante en ciertas aplicaciones, como pueden ser los implantes craneales para casos pediátricos.93

$$H = \begin{bmatrix} O & O \\ O & O \\ O & O \end{bmatrix}$$
 OH

Figura 17. Estructura química del ácido poliglicólico.

Por último, a continuación se presenta una descripción más exhaustiva de las principales características de la policaprolactona, al tratarse del material base para la obtención de las estructuras modificadas (bien por aditivación o modificación superficial) en el presente trabajo.

#### 2.5.3.1.1. POLICAPROLACTONA

La policaprolactona es un poliéster alifático con buena compatibilidad, una velocidad de degradación lenta y adecuada procesabilidad. Estas características hacen que este material sea adecuado para aplicaciones en ingeniería tisular. La policaprolactona es el material base utilizado en la formulación de composites en el presente trabajo, razón por la cual se realizará a continuación una descripción de sus principales características, así como una revisión exhaustiva del estado del arte en la fabricación de estructuras tridimensionales de este material mediante técnicas de fabricación aditiva para la regeneración de hueso.

Figura 18. Estructura química del monómero de policaprolactona.

Una de las principales limitaciones del empleo de la policaprolactona en ingeniería de tejidos es su hidrofobicidad y consiguiente falta de afinidad celular. Por esta razón, se ha propuesto la obtención de materiales composites de matriz en base PCL que contengan otras sustancias capaces de mejorar la bioafinidad de este polímero, como pueden ser los materiales cerámicos con propiedades osteoinductoras



(como la hidroxiapatita) o sustancias naturales de una mayor hidrofilicidad que la policaprolactona. En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de aditivos referenciados en la bibliografía.

Aditivo	Cantidad de aditivo incorporado	Referencia
Hidroxiapatita	5%;10% y 20%	94
Hidroxiapatita	20%	95
Biovidrio	5%; 10% y 20%	94
Óxido de grafeno	0,1%; 0,3%; 0,5% y 1%	96
Nanotubos de haloisita	2,5%; 5% y 7,5%	95
Fibroína de seda	70%	97
Silicato de calcio	10%; 30% y 50%	98

Tabla 3. Materiales composite en base policaprolactona propuestos en el estado del arte.

# TÉCNICAS DE FABRICACIÓN ADITIVA APLICABLES AL PROCESADO DE MATERIALES EN BASE POLICAPROLACTONA

Numerosos autores muestran la viabilidad de obtener estructuras tridimensionales de policaprolactona mediante técnicas de fabricación aditiva. El modelado por deposición fundida fue una de las primeras técnicas que se emplearon como alternativa a los métodos tradicionales de fabricación de scaffolds con policaprolactona con el fin de poder obtener estructuras de porosidad controlada.<sup>99</sup> Además, como ya se describió en el apartado 2.3.2. Fabricación aditiva en la regeneración de tejidos, se han valorado otras alternativas para la extrusión térmica de los termoplásticos biorreabsorbibles susceptibles de ser utilizados en aplicaciones de ingeniería de tejidos, tal es el caso de la policaprolactona. Una de las más relevantes es la microextrusión o deposición por extrusión precisa (PED), 100-102 en la que la deposición de material se realiza gracias a la acción de un husillo ubicado en el interior de un cilindro calefactado y la alimentación puede realizarse en forma de granza o polvo, en lugar de en forma de hilo, tal como se requiere en el modelado por deposición fundida. Las piezas impresas mediante procesos de fabricación aditiva basados en la extrusión térmica han sido también empleadas como moldes para la obtención de estructuras porosas en otros materiales, como son las resinas de polietilenglicol. 103 En este caso, es necesario el empleo de un postprocesado para retirar el molde fabricado en policaprolactona utilizando disolventes apropiados, como el cloroformo y, por tanto, este material no forma parte de la estructura final. 103

En cuanto a las estrategias de mejora de las propiedades de la policaprolactona cuando se procesa a través de este tipo de técnicas, una de las alternativas que se han valorado es su aditivación, de manera similar a los ejemplos citados anteriormente para otros métodos de fabricación (Tabla 3). En los procesos de extrusión térmica, las sustancias orgánicas con alta bioafinidad anteriormente referenciadas (como la fibroína de seda) no pueden ser empleadas como aditivo, puesto que tienen una temperatura de degradación térmica inferior a los valores necesario para el procesado de la matriz (Tabla 4). Por esta razón, en los *composites* de base policaprolactona procesados mediante este tipo de técnica de fabricación destacan las combinaciones



con materiales cerámicos. 104 En esta línea, Park y colaboradores 105 han obtenido estructuras de TCP y policaprolactona mediante impresión 3D en las que el TCP es capaz de incrementar la proliferación de células mesenquimales sobre la superficie del material así como su capacidad osteogenética.

Temperatura de operación	Referencia
120°C	99
130°C	105
195°C	106

Tabla 4. Valores de temperatura utilizados para la deposición por extrusión térmica de estructuras tridimensionales basadas en policaprolactona.

Otra alternativa es la utilización de un sistema de deposición multimaterial en el que se alternen zonas fabricadas en policaprolactona mediante extrusión térmica y zonas fabricadas en hidrogeles, como pueden ser aquellos en base alginato, depositadas por un sistema de extrusión sin calentamiento. Una vez depositado, es necesario reticular este hidrogel con el fin de que adquiera consistencia dimensional en la estructura final. En este sentido, son múltiples los diseños que han surgido en los últimos años a fin de combinar ambos tipos de procesos de fabricación en un único dispositivo de forma eficiente siendo un ejemplo el equipo propuesto por Biscaia y colaboradores. 100 Una de las principales limitaciones de esta estrategia es el establecimiento de unas condiciones de impresión tales que las altas temperaturas empleadas durante la deposición del material termoplástico influyan lo mínimo posible sobre las características del hidrogel.

Posteriormente, comenzó a valorarse la posibilidad de utilizar el sinterizado láser. 107 Uno de los primeros trabajos en llevar a cabo el sinterizado de policaprolactona para la obtención de scaffolds fue el llevado a cabo por Williams y colaboradores<sup>108</sup>, quienes obtuvieron estructuras con unas características mecánicas adecuadas para sustituir tejido óseo trabecular.

Posteriormente, al igual que en el modelado por deposición fundida, la combinación con materiales cerámicos osteoinductores ha sido una línea analizada como método de mejorar la afinidad celular así como las propiedades mecánicas de las estructuras obtenidas. 109,110 Para este tipo de proceso, Doyle y colaboradores 111 analizaron la importancia del tamaño de partícula de la policaprolactona para asegurar un adecuado sinterizado cuando pretende introducirse un alto porcentaje de material cerámico.

Por su parte, la utilización de la policaprolactona mediante técnicas basadas en la fotopolimerización está supeditada a la modificación de la estructura química de este material para lograr que sea procesable por estos procedimientos. A modo de ejemplo, mediante la introducción de grupos metacrilato, He y colaboradores<sup>112</sup> obtuvieron una tinta en base a oligómeros de PCL capaz de fotopolimerizar para dar lugar a estructuras impresas de PCL. Esta tinta se desarrolló con una viscosidad lo suficientemente baja para ser procesada mediante tecnología inkjet.



Por consiguiente, es posible concluir que los procesos de extrusión, especialmente aquellos basados en el modelado por deposición fundida, son el conjunto de técnicas de fabricación aditiva más interesantes y versátiles para el procesado de la policaprolactona en aplicaciones de regeneración ósea.

## PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE LA POLICAPROLACTONA

La degradación de la policaprolactona es un proceso lento, que según las características del material y las condiciones de degradación, puede oscilar entre los 2 y los 3 años. 113 La degradación de los polímeros biorreabsorbibles tiene lugar mediante procesos químicos (hidrólisis) y por procesos biológicos (a través de la acción de las enzimas y células presentes en el organismo). En el caso concreto de la policaprolactona, en las primeras etapas de degradación, el mecanismo preponderante es la hidrólisis química, dado que se ha observado que la degradación *in vivo* e *in vitro* tienen lugar a la misma velocidad durante las fases iniciales. 114 Los procesos de degradación biológicos involucran, principalmente, a los subproductos de degradación o partículas submicrométricas que pueden ser atacadas por los fagocitos, razón por la cual este tipo de procesos comienzan a tomar relevancia tras las fases iniciales de degradación hidrolítica.

$$R \xrightarrow{O} R \xrightarrow{H_2O} O CH_3 + R-OH$$

Figura 19. Reacción de hidrólisis de la policaprolactona. 115

Tal como ocurre en otros poli (α-hidroxi ésteres), la degradación hidrolítica de la PCL puede tener lugar a través de diferentes mecanismos, que son, fundamentalmente, dos: degradación en bloque y degradación superficial. 114 En la degradación en bloque, el agua es capaz de atacar cualquier punto de la matriz polimérica y la ruptura de las cadenas poliméricas tiene lugar de forma aleatoria. Los subproductos de degradación en este tipo de modelo de degradación son capaces de difundirse hacia el exterior, de manera que el efecto autocatalítico que podrían tener (al tratarse fundamentalmente de ácidos carboxílicos) no es significativo y, en consecuencia, el proceso de degradación tiene lugar de forma homogénea. Por consiguiente, la principal característica de este tipo de ruta es la disminución del peso molecular promedio de manera homogénea.

Por su parte, si la difusión de los subproductos de degradación no tiene lugar de forma eficiente, la acumulación de ácidos carboxílicos en puntos específicos de la matriz polimérica provoca que tenga lugar un fenómeno autocatalítico. Este proceso implica la aparición de un gradiente de pesos moleculares, siendo esta característica uno de los efectos que permiten distinguir el tipo de mecanismo de degradación predominante.

A nivel de la estructura química del material, la degradación hidrolítica se produce por la escisión del grupo éster siguiendo una cinética de primer orden. Los productos de degradación pueden ser metabolizados a través del ciclo de Krebs o eliminados directamente por secreción renal.<sup>116</sup>



Debido a la lenta degradación de la policaprolactona, se han explorado estrategias que aceleren el proceso con el fin de ampliar las aplicaciones en las que se puede emplear el material. La opción propuesta por Patricio et al. 117 es la mezcla con ácido poliláctico. Las estructuras PCL/PLA (50/50 wt%) propuestas por estos autores muestran un incremento del módulo de compresión que pasa de los 18,7±3,0 MPa de las piezas fabricadas en PCL a los 146,5±14,0 MPa para el caso de la combinación de materiales, lo que es un indicativo del potencial de esta estrategia.

## 2.5.3.2. MATERIALES POLIMÉRICOS DE ORIGEN NATURAL

Los polímeros de origen natural empleados en la regeneración de tejido óseo tienen como principal ventaja el presentar una mayor afinidad celular que los polímeros sintéticos anteriormente citados. No obstante, sus propiedades mecánicas son insuficientes para los requerimientos de la aplicación, razón por la que se emplean en combinación con otros materiales, frecuentemente polímeros sintéticos y/o materiales cerámicos (con especial relevancia de la hidroxiapatita).

Dentro de los polímeros de origen natural, destacan el colágeno y la gelatina (derivado parcialmente hidrolizado del colágeno), debido a la presencia del primero en el tejido natural. 118, 119 No obstante, hay otras sustancias naturales que tienen un gran interés por sus características de procesabilidad y su adecuada biocompatibilidad, entre los que destacan los carbohidratos como el alginato de sodio, el quitosano o los derivados de la celulosa. Estos últimos se proponen en la presente tesis doctoral como aditivos de la policaprolactona a fin de modular sus propiedades de afinidad con el agua y su capacidad de facilitar el anclaje y proliferación celular.

El colágeno es el principal componente de la fase orgánica de la matriz ósea. Por esta razón, es una de las sustancias de origen natural que más interés ha atraído para ser empleado como soporte en la regeneración de hueso. El colágeno se obtiene principalmente a partir de su purificación de tejido de origen animal, 120 como porcino o vacuno, principalmente. A pesar de su capacidad de mimetizar el medio extracelular del tejido óseo, sus principales desventajas son su escasa estabilidad dimensional, sus limitadas propiedades mecánicas y la posibilidad de reacción inmunitaria debido a su origen animal. Para mejorar las propiedades mecánicas de las estructuras en base colágeno, se ha propuesto la combinación con otras sustancias, como puede ser la hidroxiapatita. De hecho, una mezcla de ambos componentes diluidos en ácido acético 0,5 M fue utilizada por Lin y colaboradores<sup>121</sup> para obtener estructuras mediante fabricación aditiva, si bien la formulación de este tipo de biotinta ha de ser sumamente cuidadosa a fin de conseguir unas adecuadas condiciones de procesabilidad.

La gelatina se obtiene mediante una hidrólisis parcial del colágeno, de tal forma que éste ha perdido su estructura terciaria. Su origen es, por tanto, análogo al colágeno, es decir, se extrae de tejidos de mamíferos. En consecuencia, tiene la misma desventaja en términos de riesgo de transmisión de patógenos y respuesta inmunitaria adversa, si bien la inmunogenicidad de la gelatina es menor a la del colágeno de procedencia. 122

Durante el método de producción de la gelatina es posible modificar el punto isoeléctrico del producto a través del cambio en las condiciones de procesado. Esta



característica es interesante en aplicaciones en las que pretenda emplearse la gelatina como material de anclaje y liberación de diferentes sustancias terapéuticas. De esta forma, pueden anclarse sustancias en ambientes ácidos o básicos que serán liberadas cuando el material se vea sometido a condiciones de pH fisiológico. Otra característica química relevante de la gelatina es su solubilidad en medios acuosos, lo que hace necesaria una etapa de reticulación a fin de garantizar su estabilidad *in vivo*. <sup>123</sup> La reticulación de la gelatina puede realizarse por métodos físicos o químicos, si bien los procedimientos químicos ofrecen un mejor control de las propiedades finales. De entre los reticulantes químicos existentes, uno de los más interesantes es la genipina, debido a su biocompatibilidad.

Por otra parte, tal como se comentó anteriormente en el caso del colágeno, la combinación de la gelatina con hidroxiapatita es una estrategia que ha sido valorada para obtener *scaffolds* capaces de mimetizar de una forma más conveniente la estructura del tejido óseo que pretende reemplazarse.<sup>123</sup>

En cuanto a la utilización de técnicas de fabricación aditiva con este material, cabe destacar la existencia de estudios relacionados con la modificación de la estructura de la gelatina para introducir grupos metacrílicos con el fin de obtener una resina fotopolimerizable que puede ser empleada para llevar a cabo procesos de bioimpresión.

Con respecto a los carbohidratos que se utilizan en aplicaciones de ingeniería de tejidos para la regeneración de hueso cabe destacar el quitosano y el alginato.

El alginato es un polisacárido compuesto por unidades de ácido  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-gulurónico (Figura 20). Son compuestos que se extraen de las algas marinas y tienen un carácter polianiónico gracias a los grupos carboxilo presentes en su estructura. La formación de sales de alginato a partir del ácido algínico es un proceso en el que tiene lugar un cambio sustancial de las propiedades del material. Así, cuando se forma la sal de calcio, se producen cambios conformacionales con la finalidad de acomodar a este catión divalente en la red. Este proceso conlleva la gelificación del material obteniéndose una estructura tridimensional de las cadenas denominada "caja de huevo".

Figura 20. Estructura química del alginato de calcio.

Tal como ocurre con otras sustancias poliméricas de origen natural, es conveniente emplear sustancias capaces de incrementar las propiedades mecánicas del alginato, como puede ser la hidroxiapatita con el fin de obtener estructuras en base alginato con las características adecuadas para su aplicación en la regeneración de tejido óseo. 124 Sin embargo, debido a las insuficientes características mecánicas de



este material, es más común emplear el alginato como sustancia auxiliar destinada a mejorar las propiedades de la estructura principal, fabricada en materiales con una resistencia más adecuada para la aplicación. Un ejemplo es la alternativa que siguieron Zhao y colaboradores, 80 quienes evaluaron el empleo de estructuras tridimensionales de biovidrio obtenidas mediante fabricación aditiva que posteriormente son recubiertas con alginato mediante inmersión y reticulación. En estas estructuras, la presencia del alginato favorece la adhesión celular y, además, mejora las propiedades a compresión de los scaffolds.

Por su parte, el quitosano o chitosán, es un polisacárido lineal compuesto por unidades de glucosamina y N-acetil-glucosamina unidas por enlaces B(1-4) glicosídicos (Figura 21) que se obtiene a partir de la quitina, componente principal del exoesqueleto de los artrópodos. Se trata de un polianión biocompatible y con actividad antimicrobiana, característica de gran utilidad para prevenir infecciones postquirúrgicas al implantar la estructura soporte.

Figura 21. Estructura química del quitosano.

En cuanto a las técnicas de fabricación empleadas para obtener estructuras de quitosano, destaca el electrospinning, 125 obteniéndose estructuras composites con otros polímeros como pueden ser el alcohol polivinílico<sup>126</sup> o el PLGA. <sup>127</sup> Más recientemente, destaca la utilización del quitosano como componente fundamental en la formulación de scaffolds invectables con utilidad en el tratamiento de lesiones subcondrales de manera mínimamente invasiva. 128

Si bien el alginato y el quitosano son los dos polisacáridos más ampliamente analizados para aplicaciones de ingeniería de tejidos, existen otras alternativas que, si bien menos exploradas, tienen un gran potencial, especialmente empleados en combinación con otros polímeros sintéticos. En este sentido, en la presente tesis doctoral se ha evaluado el efecto de la aditivación de la policaprolactona con celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa, así como el empleo del extracto del aloe vera (rico en polisacáridos bioactivos) como recubrimiento de estructuras porosas del mismo material.

#### 2.5.3.2.1. CELULOSA MICROCRISTALINA

La celulosa es un polisacárido compuesto por unidades de glucosa unidas a través de enlaces B(1,4)-glucosídicos (Figura 22).

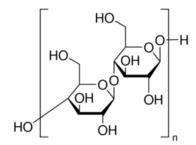


Figura 22. Estructura de las unidades monoméricas de la celulosa microcristalina. 129

La celulosa microcristalina se obtiene a través de la purificación y despolimerización parcial de la celulosa. El método de obtención de esta sustancia se basa en una hidrólisis ácida controlada de la alfa-celulosa. El proceso de hidrólisis ataca preferentemente a las fracciones amorfas de las cadenas poliméricas, de tal forma que es posible obtener una fracción sólida de celulosa de una cristalina mayor (55-80%)<sup>130</sup> a la alfa-celulosa utilizada como materia prima: la celulosa microcristalina (Figura 23).

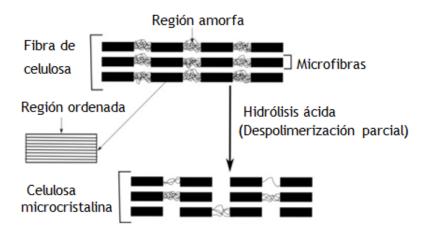


Figura 23. Esquema del proceso de obtención de la celulosa microcristalina a partir de fibras de celulosa. 130

El potencial de la celulosa como medio soporte en ingeniería de tejidos ha sido analizado por múltiples autores en trabajos previos. A modo de ejemplo, Jia y colaboradores<sup>131</sup> propusieron la utilización de microcristales de celulosa y filamentos finos de celulosa para obtener *scaffolds* mediante electrospinning capaces de dar soporte para el crecimiento de células musculares para tejido vascular. Por otra parte, Courtenay y colaboradores<sup>132</sup> han estudiado cómo diferentes tipos de tratamientos superficiales en láminas de celulosa pueden mejorar la afinidad celular de este material. Esta experiencia previa demuestra la viabilidad de la utilización de la celulosa como material soporte que permite la proliferación celular para aplicaciones de ingeniería tisular.



Además, se trata de una sustancia de interés como agente de refuerzo en la formulación de biocomposites en base termoplástica, como puede ser el polipropileno reciclado<sup>133</sup> o el ácido poliláctico.<sup>134</sup> No obstante, para las aplicaciones industriales presenta el inconveniente de tratarse de un material con una alta capacidad de absorción de humedad. Este inconveniente puede resultar en una ventaja en la formulación de composites susceptibles de ser empleados como material soporte para ingeniería de tejidos.

Por otra parte, la descomposición de la celulosa microcristalina (MCC) tiene lugar ente los 250-450°C. 130 Esta temperatura es superior a los valores observados en la bibliografía como habituales para la impresión mediante modelado por deposición fundida para la obtención de estructuras de base policaprolactona (Tabla 4). Por tanto, cabe esperar que el composite obtenido mediante la aditivación de policaprolactona con celulosa microcristalina tenga una temperatura de degradación superior a la temperatura de procesado, en caso de que este sea posible. No obstante, cabe mencionar en este punto que, debido a que la celulosa no es un termoplástico, su concentración deberá mantenerse baja a fin de garantizar su procesabilidad mediante métodos de extrusión térmicos.

En el presente estudio se propone evaluar la aditivación de la policaprolactona con celulosa microcristalina como forma de obtener un material composite con una rigidez superior a la de la policaprolactona pura, así como una mayor afinidad por el agua. Esta última característica puede conllevar, además, una mejora de la afinidad celular de la estructura. Todos estos aspectos se han evaluado a lo largo del desarrollo experimental de la presente tesis doctoral y los resultados obtenidos se presentan en el Capítulo 4. Evaluación de la introducción de celulosa microcristalina como aditivo.

## 2.5.3.2.2. CARBOXIMETILCELULOSA

La hidrofilicidad de la celulosa se justifica teniendo en cuenta la gran cantidad de grupos hidroxilo presentes en su estructura. Su introducción en una matriz de policaprolactona se propone como forma de incrementar la afinidad por el agua de esta última, tal como se comentó anteriormente.

Si, además de los grupos hidroxilo, se presentaran en la cadena polimérica otros grupos funcionales afines a la interacción con componentes de la matriz extracelular es posible que el aditivo tuviera una mayor afinidad en términos de anclaje y proliferación celular. Por tanto, es posible proponer derivados de la celulosa en los que se hayan introducidos grupos funcionales susceptibles de proporcionar dicho efecto.

En este sentido, se propone en este estudio analizar las posibilidades de la carboximetilcelulosa (CMC). Este polímero es un éter derivado de la celulosa. Por tanto, es posible encontrar en su unidad monomérica (Figura 24) grupos carboximetil, además de grupos hidroxilo.



Figura 24. Estructura química de la carboximetilcelulosa de sodio.

La CMC y sus derivados son utilizados habitualmente en aplicaciones biomédicas como portadores en sistemas de liberación controlada, si bien su potencial en aplicaciones de ingeniería de tejidos tiene un desarrollo menor.

Para mejorar las propiedades de la carboximetilcelulosa e incrementar las potenciales aplicaciones de esta sustancia en ingeniería de tejidos, se ha propuesto la combinación con otras sustancias. A modo de ejemplo, Pasqui y colaboradores <sup>135</sup> analizaron el comportamiento biológico de un hidrogel híbrido de carboximetil celulosa e hidroxiapatita con osteoblastos línea MG63. Observaron que la presencia de la hidroxiapatita en este hidrogel mejora la proliferación celular, la actividad metabólica y la producción de matriz celular. Por su parte, Odabas<sup>136</sup> evaluó la posibilidad de obtener un hidrogel de colágeno-carboximetilcelulosa-fosfato de calcio con un módulo de compresión en seco de entre 0,3 MPa para el gel sin fosfato de calcio y 0,5 MPa para el gel que contiene el aditivo cerámico. A pesar de que estos valores sean muy inferiores a los del tejido óseo, el autor describe propiedades interesantes en términos de hinchamiento y biocompatibilidad para su utilización en otras aplicaciones de la ingeniería de tejidos.

Por su parte, Singh et al.<sup>137</sup> han propuesto la obtención de *scaffolds* obtenidos con material compuesto de fibroína de seda y carboximetil celulosa mediante electrospinning. Estos autores señalan que la presencia de la carboximetil celulosa es capaz de mejorar el proceso de biomineralización debido a que los grupos hidroxilo y carboxilo presentes en la matriz son puntos de nucleación preferentes de los iones Ca<sup>2+</sup>. A su vez, estos iones adsorben los iones fosfato del medio produciendo la formación de los cristales.

Por consiguiente, las referencias analizadas justifican el potencial de esta sustancia en aplicaciones de ingeniería de tejidos y, de forma específica, en la regeneración de tejido óseo. Sin embargo, no se han encontrado trabajos previos en los que se utilice esta sustancia como aditivo de una matriz de policaprolactona. Por ello, se ha decidido incluir este derivado de la celulosa para la formulación de materiales *composites* de base policaprolactona y evaluar el efecto que tiene dicha aditivación sobre la procesabilidad del material mediante técnicas de fabricación aditiva, así como sobre las propiedades mecánicas, morfológicas y biológicas de las estructuras obtenidas. Los resultados de este análisis se presentan en el *Capítulo 5*. *Evaluación de la introducción de carboximetilcelulosa como aditivo*.



#### 2.5.3.2.3. Polisacáridos del Aloe vera

Otro polisacárido de interés para aplicaciones de regeneración ósea es el acemanano, compuesto de demostrada actividad osteogenética<sup>125</sup> presente en el extracto del aloe vera. El aloe vera es una planta cuyo extracto tiene propiedades regenerativas y que se ha introducido en el presente estudio como recubrimiento a estructuras de base policaprolactona. Por esta razón, se incluye a continuación una descripción de las principales características de esta especie, así como una revisión de los trabajos previos en la aplicación de sus extractos para ingeniería de tejidos, con especial énfasis a aquellos estudios centrados en la regeneración ósea.

La planta de aloe vera puede ser clasificada como una planta xerófila de hojas suculentas de la familia *Liliceal*. 138







Figura 25. Planta de Aloe Vera.

Las hojas del aloe vera tienen de 60 a 90 cm de longitud y entre 5 y 10 cm de ancho. Están formadas por una corteza externa verde debajo de la cual se encuentran los haces vasculares del xilema y el floema. La parte interna de la hoja está compuesta por un parénquima o pulpa. Este parénquima, a su vez, contiene un líquido viscoso claro denominado gel o mucílago.



Figura 26. Detalle hoja de Aloe Vera.

Existen referencias históricas de la aplicación del aloe vera con propósitos medicinales. La reseña más antigua se remonta a los sumerios del siglo XVII a.C., quienes citan las propiedades laxantes de esta planta. Además, es posible encontrar menciones a las propiedades medicinales del aloe vera en textos griegos, egipcios, chinos e indios.

Se trata de una especie originaria de África que se desarrolla en climas cálidos, si bien actualmente se cultiva en gran cantidad de países tropicales y subtropicales. De hecho, su cultivo a nivel comercial se encuentra distribuido en países localizados en todas las regiones de climas cálidos (Tabla 5).



País	Hectáreas cultivadas
México	14000
Venezuela	9800
China	6500
República Dominicana	3500
Tailandia	1500
Estados Unidos	650
Costa Rica	520
Uganda	380
Colombia	330
India	300
Brasil	290
Malasia	270
España	250

Tabla 5. Principales productores de Aloe Vera (datos de 2004-2011). 139

A pesar de la larga tradición en la utilización terapéutica del aloe vera, no hay un criterio unánime para la explicación de sus beneficios. Los polisacáridos contenidos en el gel han demostrado tener una gran bioactividad en diversos productos de la industria farmacéutica y alimentaria, <sup>140</sup> si bien muchos autores defienden que es la sinergia entre los diferentes componentes los que otorgan la actividad biológica.

El gel del aloe vera tiene en torno a un 99,5% de agua. El resto es material sólido entre los que es posible mencionar vitaminas (B1, B2, B6, C,  $\alpha$ -tocoferol, etc.), minerales, enzimas (fosfatasa alcalina, amilasa, catalasa, lipasa, carboxipeptidasas, etc.), polisacáridos (manano acetilado, glucomanano acetilado, galactano, glucogalactanomanano, celulosa, arabinogalactano, etc.), compuestos fenólicos (antraquinonas como la aloína o el antranol) y ácidos orgánicos. Los componentes mayoritarios de esta fracción sólida son los polisacáridos, especialmente los basados en manosa.

Es importante tener en consideración que las cantidades relativas de los diferentes componentes del aloe vera se encuentran influenciados por la localización geográfica de la planta, así como por la estacionalidad, dada la función de reserva que suponen los carbohidratos. 140,141

En cuanto a su potencial para el empleo en aplicaciones de ingeniería de tejidos, Chantarawaratit y colaboradores<sup>142</sup> desarrollaron esponjas de acemanano que fueron analizadas *in vivo* en el tratamiento de defectos periodontales en perros consiguiéndose una mejora de la proliferación celular y la deposición mineral. Por su parte, en el estudio desarrollado por Boonyagul y colaboradores <sup>143</sup>, quienes también analizaron el potencial del acemanano en el tratamiento de lesiones periodontales, se verificó la capacidad osteoinductora de este compuesto. Además, ya existen algunos estudios para el desarrollo de *scaffolds* que contienen extractos de aloe vera para la



regeneración de tejido óseo no limitada al tratamiento de lesiones periodontales, como es el trabajo de Shanmugavel y colaboradores. 144 o el de Godoy y colaboradores. 145

No obstante, su aplicación es aún muy restringida y es necesario realizar una evaluación exhaustiva de la viabilidad de la aplicación de los extractos de esta planta en la fabricación de estructuras soporte para regeneración ósea, siendo este uno de los objetivos más relevantes de este estudio. En concreto, se propone la utilización del extracto de aloe vera en forma de recubrimiento sobre estructuras porosas de policaprolactona obtenidas mediante técnicas de fabricación aditiva. El procedimiento de recubrimiento se basa en la funcionalización previa de las piezas mediante tratamiento con plasma. Por esta razoón, a continuación se recoge una breve descripción de las características más relevantes del tratamiento por plasma como estrategia de mejora de los scaffolds poliméricos sintéticos, así como una revisión de trabajos en los que esta alternativa se ha aplicado sobre estructuras de base policaprolactona.

Esta revisión supone el punto de partida para el establecimiento de las condiciones del pretratamiento de las estructuras como forma de realizar el recubrimiento con extracto de aloe. Los resultados de los análisis llevados a cabo con piezas recubiertas con esta sustancia se presentan en el Capítulo 6. Evaluación de tratamientos superficiales. Recubrimiento con aloe vera.

# 2.6. TRATAMIENTOS SUPERFICIALES PARA EL INCREMENTO DE LA ADHESIÓN CELULAR EN ESTRUCTURAS SOPORTE POLIMÉRICAS

Las estructuras soporte en ingeniería tisular deberían, idealmente, recibir y responder a las señales de crecimiento celular para favorecer su anclaje, proliferación, diferenciación y, en consecuencia, la regeneración del tejido. 146 No obstante, los materiales polímeros más ampliamente empleados por sus adecuadas propiedades mecánicas, su biocompatibilidad y su adecuada velocidad de degradación, como son el ácido poliláctico, la policaprolactona o el ácido poliglicólico, no poseen en su estructura grupos funcionales capaces de actuar con las sustancias involucradas en el proceso de adhesión celular. En apartados anteriores ya se mencionó que se ha propuesto la formulación de composites como forma de mejorar la afinidad biológica de la policaprolactona. Otra alternativa consiste en modificar la superficie de la estructura. Esta modificación puede consistir en la funcionalización de la estructura química del material base o bien en el recubrimiento de los scaffolds con sustancias bioactivas.

La funcionalización de la superficie de materiales poliméricos puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas (Tabla 6). Sin embargo, la más explorada en el estado del arte, debido a su efectividad es el tratamiento por plasma, razón por la cual se incluye a continuación una descripción de las principales características de esta alternativa.



Tipo de tratamiento superficial	Material base	Referencia
Activación química- tratamiento alcalino	Policaprolactona	147,148
Tratamiento con ozono e inmovilización de péptidos	Ácido poliláctico	149
Tratamiento con ozono e inmovilización de factores de crecimiento	Policaprolactona	150

Tabla 6. Ejemplo de modificaciones superficiales sobre estructuras de polímeros sintéticos para la mejora de sus propiedades en ingeniería de tejidos.

#### 2.6.1. TRATAMIENTO CON PLASMA

Una de las opciones más versátiles en el tratamiento de biomateriales es su modificación con plasma, que puede tener diferentes objetivos: <sup>151</sup>

- Introducción de grupos funcionales.
- Injertos de otras sustancias.
- Introducción de rugosidad superficial.
- Formación de una capa reticulada.
- Recubrimiento laminar.

Para la generación de grupos funcionales, se utilizan habitualmente como fuentes aire, oxígeno o amoniaco para la introducción de grupos carboxilo o amino. <sup>151</sup> A modo de ejemplo, Sardella y colaboradores <sup>152</sup> han caracterizado la formación de grupos funcionales con nitrógeno y oxígeno que incrementan la hidrofilicidad de estructuras de policaprolactona, así como los valores de viabilidad celular de líneas Saos-2 de osteoblastos mediante el tratamiento de dichas estructuras con plasma de nitrógeno y agua.

En ocasiones, la formación de grupos funcionales es utilizada para el anclaje de proteínas, péptidos o polisacáridos que favorecen la adhesión y proliferación celular. Una de las propuestas que pueden encontrarse en la bibliografía en esta línea es la realizada por Sousa y colaboradores, <sup>153</sup> quienes utilizaron esta estrategia para realizar un recubrimiento superficial estable de colágeno sobre una matriz de policaprolactona a partir de la activación de dicha matriz con plasma de argón y posterior formación de peróxidos e hidroperóxidos como centros para el anclaje (Figura 27).



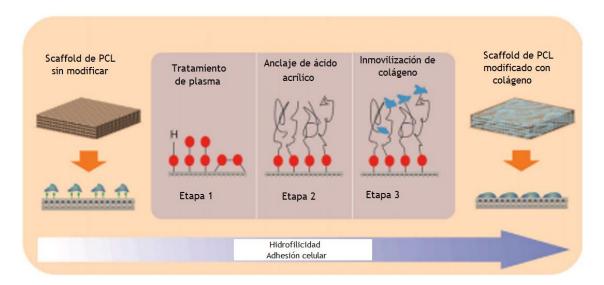


Figura 27. Proceso de recubrimiento de scaffolds de policaprolactona con colágeno mediante activación con plasma. 153

El tratamiento con plasma también puede emplearse para modificar la estructura microtopográfica de superficies. Este parámetro también afecta a la funcionalidad de la estructura, ya que la adhesión inicial de las células está correlacionada con el área superficial disponible. Un ejemplo de esta estrategia puede encontrarse en el trabajo de Wang y colaboradores, 154 quienes utilizaron plasma frío para crear rugosidad superficial en estructuras composites de nanohidroxiapatita y chitosan obtenidas mediante dispersión y liofilización con resultados positivos en cuanto a expresión proteica de células mesenquimales de tejido óseo.

Dado que la policaprolactona es el material base utilizado en el desarrollo de la presente tesis doctoral, se relacionan a continuación algunos de los trabajos previos encontrados en la bibliografía al respecto del incremento de la bioactividad de este material a través del empleo de tratamientos superficiales de plasma.

# 2.6.1.1. TRATAMIENTOS CON PLASMA APLICADOS A ESTRUCTURAS DE POLICAPROLACTONA

Es posible encontrar en la literatura diversos estudios en los que se han evaluado diferentes gases (Tabla 7) y parámetros de trabajo capaces de incrementar la hidrofilicidad con respecto al material sin tratar, lo que demuestra el potencial del tratamiento con plasma en el incremento de la bioactividad de estructuras tridimensionales fabricadas en este material. De entre los estudios revisados, cabe destacar la comparativa que realizaron Suntornnond y colaboradores, 155 quienes demuestran que el tratamiento con argón es más eficiente en cuanto al aumento de la hidrofilicidad del material que el tratamiento con oxígeno, si bien este último es el más ampliamente utilizado, tal como puede comprobarse en la siguiente tabla (Tabla 7). En este punto, cabe destacar que la utilización de aire en lugar de oxígeno provoca la inserción de cierta cantidad de grupos nitrogenados ya que, a pesar de que el nitrógeno es un gas inerte, bajo las condiciones de plasma proporciona radicales capaces de interactuar con la superficie polimérica. 156,157



Tipo de gas empleado	Referencia
Oxígeno	148,155,157,158
Aire	156
Etileno/nitrógeno	159
Argón	155
Amoniaco	158
Dióxido de azufre	158
Nitrógeno	157

Tabla 7. Gases empleados en estudios previos para la funcionalización de superficies de policaprolactona mediante tratamiento con plasma.

Por otra parte, Can-Herrera y colaboradores<sup>156</sup> demostraron que existe correlación entre el tiempo y la potencia empleada y la densidad superficial de grupos funcionales generados (en este caso grupos carboxilo al ser el gas utilizado el aire). La posibilidad de manejar la cantidad de grupos funcionales presentes en la superficie mediante la modificación de los parámetros de operación es de gran interés si pretenden obtenerse estructuras con gradientes de bioactividad, por lo que tiene un gran potencial para ciertas aplicaciones en la ingeniería de tejidos.

En cuanto al empleo de los tratamientos con plasma en estructuras tridimensionales de policaprolactona, Domingos y colaboradores <sup>159</sup> referencian la dificultad de aplicar de forma eficiente el tratamiento por plasma en estructuras porosas obtenidas por técnicas convencionales en las que no es posible controlar la distribución e interconectividad de los poros. Estos autores señalan que las características de porosidad obtenidas en piezas fabricadas mediante impresión 3D favorecen que la difusión necesaria para que el tratamiento por plasma ataque no solo a la cara exterior, sino también a la superficie interna de la estructura.

Por otra parte, la funcionalización con plasma es útil para realizar el anclaje de diferentes sustancias bioactivas. De entre los trabajos previos analizados en la presente revisión bibliográfica, destacan la gelatina y el colágeno (Tabla 8), debido a la actividad biológica que poseen estos dos polímeros naturales, tal como se describió anteriormente en el apartado *Materiales poliméricos de origen natural*.

Tipo de gas empleado	Sustancia bioactiva anclada a la superficie	Referencia
Argón	Colágeno	153,155
Oxígeno	Colágeno	155
Aire	Gelatina	160
Aire	Colágeno	160

Tabla 8. Estudios previos en los que el tratamiento con plasma es utilizado para la inmovilización de sustancias bioactivas.

En este trabajo se ha decidido emplear esta estrategia para el anclaje del extracto del aloe vera. A pesar de las propiedades regenerativas de esta sustancia, no



se han encontrado referencias de emplear este procedimiento para aprovechar sus propiedades para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

#### 2.7. CONCLUSIONES

La búsqueda de nuevos materiales para la fabricación de estructuras soporte para la regeneración de tejido óseo es un área de gran interés para el desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas.

A raíz de la revisión bibliográfica llevada a cabo en el presente capítulo, es posible concluir que, debido a la complejidad de mimetizar el tejido biológico existe una tendencia a la combinación de diferentes materiales a fin de aprovechar las ventajas relativas de cada uno de ellos. Esta combinación puede realizarse bien a través de la utilización de materiales composites o bien, mediante el empleo de estructuras multicapa. Otra alternativa para mejorar las propiedades de las estructuras empleadas como soportes capaces de promover la regeneración ósea es el tratamiento superficial de las mismas. Los tratamientos superficiales se basan en la funcionalización con plasma o bien en el empleo de recubrimientos bioactivos. En ambos casos, la finalidad es la misma: incrementar la afinidad celular de la superficie y/o la capacidad de diferenciación hacia una línea de interés de células pluripotenciales.

En este trabajo, se han evaluado propuestas en ambas líneas: la aditivación para la formulación de materiales composites de base policaprolactona y el tratamiento de la superficie de piezas del mismo material. Se ha seleccionado dicho material debido a su potencial para la regeneración de tejido óseo, tal como queda evidenciado en el Estado del Arte que se ha citado en este capítulo.

Por último, la revisión llevada a cabo demuestra las ventajas de las técnicas de fabricación aditiva para la obtención de estructuras porosas para su aplicación en Ingeniería de Tejidos frente al empleo de otras técnicas convencionales de fabricación.



#### 2.8. REFERENCIAS

- 1. Yeong W-Y, Chua C-K, Leong K-F, Chandrasekaran M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. Trends in Biotechnology 2004;22(12):643-652.
- 2. Tran V. Rapid prototyping technologies for tissue regeneration. Rapid Prototyping of Biomaterials. Principles and Applications.: Woodhead Publisher.
- 3. George JH. Engineering of fibrous scaffolds for use in regenerative medicine. (Dissertation): Imperial College of London; 2009.
- 4. Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. Australian Dental Journal 2014;59(SUPPL. 1):117-130.
- 5. Markets Ma. Biomaterials Market by Type of Materials (Metallic, Ceramic, Polymers, Natural) & Application (Cardiovascular, Orthopedic, Dental, Plastic Surgery, Wound Healing, Neurology, Tissue Engineering, Ophthalmology) Global Forecast to 2021; 2016.
- 6. Research GV. Tissue Engineering Market Worth \$11.5 Billion By 2022; 2016.
- 7. Insights GM. Tissue Engineering Market Size, Industry Analysis Report, Regional Outlook (U.S., Germany, UK, Italy, Russia, China, India, Japan, South Korea, Brazil, Mexico, Saudi Arabia, UAE, South Africa), Application Development, Competitive Market Share & Forecast, 2016 2023.
- 8. Vasallo Torres FJ. Análisis de los factores de riesgo para la osteointegración en implantes dentales. Estudio retrospectivo. España: Universidad Rey Juan Carlos; 2011.
- 9. Sachlos E, Czernuszka JT, Gogolewski S, Dalby M. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineeringscaffolds. European Cells and Materials 2003;5:29-40.
- 10. Moroni L, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. Biomaterials 2006;27(7):974-985.
- 11. Zhu N, Li MG, Cooper D, Chen XB. Development of novel hybrid poly(l-lactide)/chitosan scaffolds using the rapid freeze prototyping technique. Biofabrication 2011;3(3).
- 12. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. Progress in Polymer Science 2010;35(4):403-440.
- 13. Leong KF, Cheah CM, Chua CK. Solid freedom fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. Biomaterials 2003;24:2363-2378.
- 14. Iwan Zein DWH, Kim Cheng Tan, Swee Hin Teoh. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. Biomaterials (23) 2002:1169-1185.
- 15. Melchels FPW, Domingos MAN, Klein TJ, Malda J, Bartolo PJ, Hutmacher DW. Additive manufacturing of tissues and organs. Progress in Polymer Science 2012;37(8):1079-1104.
- 16. Giannatsis J, Dedoussis V. Additive fabrication technologies applied to medicine and health care: a review. Journal of Advanced Manufacturing Technology 2009;40:116-127.



- 17. Fantini M, De Crescenzio F, Ciocca L, Persiani F. Additive manufacturing to assist prosthetically guided bone regeneration of atrophic maxillary arches. Rapid Prototyping Journal 2015;21(6):705-715.
- 18. Russmueller G, Liska R, Stampfl J, Heller C, Mautner A, Macfelda K, Kapeller B, Lieber R, Haider A, Mika K and others. 3D printable biophotopolymers for in vivo bone regeneration. Materials 2015;8(6):3685-3700.
- Piard CM, Chen Y, Fisher JP. Cell-Laden 3D Printed Scaffolds for Bone Tissue 19. Engineering. Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism 2015;13(4):245-255.
- 20. Comeau BM. Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds Using Stereolithography. United States: Georgia Institute of Technology; 2007.
- Khantan Sabree I. Fabrication of Bioactive Glass Scaffolds by Stereolithography 21. for Bone Tissue Engineering University of Manchester; 2014.
- 22. Arcaute K, Mann BK, Wicker RB. Practical use of hydrogels in stereolitography for tissue engineering applications. In: Bartolo P, editor. Stereolithography: Springer; 2011.
- 23. Santos ARC, Almeida HA, Bártolo PJ. Additive manufacturing techniques for scaffold-based cartilage tissue engineering: A review on various additive manufacturing technologies in generating scaffolds for cartilage tissue engineering. Virtual and Physical Prototyping 2013;8(3):175-186.
- 24. Elomaa L. Teixeira S. Hakala R. Korhonen H. Grijpma DW. Seppälä JV. Preparation of poly(ε-caprolactone)-based tissue engineering scaffolds by stereolithography. Acta Biomaterialia 2011;7(11):3850-3856.
- Yeong WY, Sudarmadji N, Yu HY, Chua CK, Leong KF, Venkatraman SS, Boey 25. YCF, Tan LP. Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering. Acta Biomaterialia 2010;6(6):2028-2034.
- Kolan KCR, Thomas A, Leu MC, Hilmas G. In vitro assessment of laser sintered 26. bioactive glass scaffolds with different pore geometries. Rapid Prototyping Journal 2015;21(2):152-158.
- 27. Liu FH. Synthesis of biomedical composite scaffolds by laser sintering: Mechanical properties and in vitro bioactivity evaluation. Applied Surface Science 2014;297:1-8.
- 28. Liu FH, Lee RT, Lin WH, Liao YS. Selective laser sintering of bio-metal scaffold. 2013. p 83-87.
- Chen CH, Shyu VBH, Chen JP, Lee MY. Selective laser sintered poly-E-29. caprolactone scaffold hybridized with collagen hydrogel for cartilage tissue engineering. Biofabrication 2014;6(1).
- Schantz JT, Lim TC, Ning C, Swee HT, Kim CT, Shih CW, Hutmacher DW. 30. Cranioplasty after trephination using a novel biodegradable burr hole cover: Technical case report. Neurosurgery 2006;58(SUPPL. 1):ONS-176.
- Shor L, Güçeri S, Chang R, Gordon J, Kang Q, Hartsock L, An Y, Sun W. Precision 31. extruding deposition (PED) fabrication of polycaprolactone (PCL) scaffolds for bone tissue engineering. Biofabrication 2009;1(1).
- Tirella A, De Maria C, Criscenti G, Vozzi G, Ahluwalia A. The PAM 2 system: A 32. approach for fabrication of complex three-dimensional multilevel microstructures. Rapid Prototyping Journal 2012;18(4):299-307.
- 33. Trew M, Everett T. Fundamentos del movimiento humano. España: Elsevier; 2006.



- 34. De la Mata LLord J. Estructura del hueso y de los sistemas celulares. In: Nolla J, editor. Enfermedades óseas. España: Masson; 1997.
- 35. García-Garduño MV, Reyes-Gasga J. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. Revista Especializada en Ciencias Químico-biológicas 2006:90-95.
- 36. Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. Materials Today 2008;11(5):18-25.
- 37. Castelo-Branco C. Osteoporosis y menopausia. España: Editorial Panamericana; 2008.
- 38. Welsch U. Histología. España: Editorial Panamericana; 2006.
- 39. Oftadeh R, Perez-Viloria M, Villa-Camacho JC, Vaziri A, Nazarian A. Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review. Journal of Biomechanical Engineering 2015;137(1).
- 40. Deplaine H. Scaffold design and characterisation for osteochondral tissue regeneration. Spain: Universitat Politècnica de València; 2012.
- 41. Greene W. Ortopedia: Elsevier; 2007.
- 42. Caeiro J, González P, Guede D. Biomecánica y hueso: Ensayos en los distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la resistencia ósea. Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral 2013;5(2):99-108.
- 43. Molist García P, Pombal Diego MÁ. Atlas de histología vegetal y animal. Departamento de biología funcional y ciencias de la salud. Universidad de Vigo.
- 44. Nazarian A, Muller J, Zurakowski D, Müller R, Snyder BD. Densitometric, morphometric and mechanical distributions in the human proximal femur. Journal of Biomechanics 2007;40(11):2573-2579.
- 45. Morgan EF, Bayraktar HH, Keaveny TM. Trabecular bone modulus-density relationships depend on anatomic site. Journal of Biomechanics 2003;36(7):897-904.
- 46. Vale AC, Pereira MFC, Maurício A, Amaral P, Rosa LG, Lopes A, Rodrigues A, Caetano-Lopes J, Vidal B, Monteiro J and others. Micro-computed tomography and compressive characterization of trabecular bone. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 2013;438(Supplement C):199-205.
- 47. Shegarfi H, Reikeras O. Review article: bone transplantation and immune response. Journal of orthopaedic surgery (Hong Kong) 2009;17(2):206-211.
- 48. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. Materials Science and Engineering C 2017;78:1246-1262.
- 49. Moghe AK, Gupta BS. Co-axial electrospinning for nanofiber structures: Preparation and applications. Polymer Reviews 2008;48(2):353-377.
- 50. Yu Y, Hua S, Yang M, Fu Z, Teng S, Niu K, Zhao Q, Yi C. Fabrication and characterization of electrospinning/3D printing bone tissue engineering scaffold. RSC Advances 2016;6(112):110557-110565.
- 51. Liu H, Peng H, Wu Y, Zhang C, Cai Y, Xu G, Li Q, Chen X, Ji J, Zhang Y and others. The promotion of bone regeneration by nanofibrous hydroxyapatite/chitosan scaffolds by effects on integrin-BMP/Smad signaling pathway in BMSCs. Biomaterials 2013;34(18):4404-4417.



- 52. Ren K, Wang Y, Sun T, Yue W, Zhang H. Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes. Materials Science and Engineering C 2017;78:324-332.
- 53. Kim HW, Lee HH, Knowles JC. Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapaite/ poly(lactic acid) for bone regeneration. Journal of Biomedical Materials Research - Part A 2006;79(3):643-649.
- 54. Mouthuy P-A, Crossley A, Ye H. Fabrication of calcium phosphate fibres through electrospinning and sintering of hydroxyapatite nanoparticles. Materials Letters 2013;106:145-150.
- 55. Serra IR, Fradique R, Vallejo MCS, Correia TR, Miguel SP, Correia IJ. Production and characterization of chitosan/gelatin/B-TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration. Materials Science and Engineering C 2015;55:592-604.
- Vahabi S, Torshabi M, Esmaeil Nejad A. In vitro comparison of the efficacy of 56. TGF-B1 and PDGF-BB in combination with freeze-dried bone allografts for induction of osteogenic differentiation in MG-63 osteoblast-like cells. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2016;27(12).
- 57. Thadavirul N, Pavasant P, Supaphol P. Improvement of dual-leached polycaprolactone porous scaffolds by incorporating with hydroxyapatite for bone tissue regeneration. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2014;25(17):1986-2008.
- Tang G, Zhang H, Zhao Y, Zhang Y, Li X, Yuan X. Preparation of PLGA scaffolds 58. with graded pores by using a gelatin-microsphere template as porogen. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2012;23(17):2241-2257.
- 59. Du Y, Liu H, Yang Q, Wang S, Wang J, Ma J, Noh I, Mikos AG, Zhang S. Selective laser sintering scaffold with hierarchical architecture and gradient composition for osteochondral repair in rabbits. Biomaterials 2017;137(Supplement C):37-
- 60. Reyes R, Delgado A, Sánchez E, Fernández A, Hernández A, Evora C. Repair of an osteochondral defect by sustained delivery of BMP-2 or TGFB1 from a bilayered alginate-PLGA scaffold. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2014;8(7):521-533.
- 61. Di Luca A, Lorenzo-Moldero I, Mota C, Lepedda A, Auhl D, Van Blitterswijk C, Moroni L. Tuning Cell Differentiation into a 3D Scaffold Presenting a Pore Shape Gradient for Osteochondral Regeneration. Advanced Healthcare Materials 2016;5(14):1753-1763.
- 62. Lopa S, Madry H. Bioinspired scaffolds for osteochondral regeneration. Tissue Engineering - Part A 2014;20(15-16):2052-2076.
- 63. Wang R, He X, Gao Y, Zhang X, Yao X, Tang B. Antimicrobial property, cytocompatibility and corrosion resistance of Zn-doped ZrO<inf>2</inf>/TiO<inf>2</inf> coatings on Ti6Al4V implants. Materials Science and Engineering C 2017;75:7-15.
- 64. Ghensi P, Bressan E, Gardin C, Ferroni L, Ruffato L, Caberlotto M, Soldini C, Zavan B. Osteo Growth Induction titanium surface treatment reduces ROS production of mesenchymal stem cells increasing their osteogenic commitment. Materials Science and Engineering C 2017;74:389-398.
- 65. Bosshardt DD, Chappuis V, Buser D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. Periodontology 2000 2017;73(1):22-40.



- 66. Liu J, Ruan J, Chang L, Yang H, Ruan W. Porous Nb-Ti-Ta alloy scaffolds for bone tissue engineering: Fabrication, mechanical properties and in vitro/vivo biocompatibility. Materials Science and Engineering: C 2017;78:503-512.
- 67. Yánez A, Herrera A, Martel O, Monopoli D, Afonso H. Compressive behaviour of gyroid lattice structures for human cancellous bone implant applications. Materials Science and Engineering: C 2016;68:445-448.
- 68. Matena J, Petersen S, Gieseke M, Kampmann A, Teske M, Beyerbach M, Escobar HM, Haferkamp H, Gellrich NC, Nolte I. SLM produced porous titanium implant improvements for enhanced vascularization and osteoblast seeding. International Journal of Molecular Sciences 2015;16(4):7478-7492.
- 69. Akmal M, Raza A, Khan MM, Khan MI, Hussain MA. Effect of nano-hydroxyapatite reinforcement in mechanically alloyed NiTi composites for biomedical implant. Materials Science and Engineering: C 2016;68:30-36.
- 70. Han C, Wang Q, Song B, Li W, Wei Q, Wen S, Liu J, Shi Y. Microstructure and property evolutions of titanium/nano-hydroxyapatite composites in-situ prepared by selective laser melting. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 2017;71:85-94.
- 71. Göncü Y, Geçgin M, Bakan F, Ay N. Electrophoretic deposition of hydroxyapatite-hexagonal boron nitride composite coatings on Ti substrate. Materials Science and Engineering: C 2017;79:343-353.
- 72. Lv H, Chen Z, Yang X, Cen L, Zhang X, Gao P. Layer-by-layer self-assembly of minocycline-loaded chitosan/alginate multilayer on titanium substrates to inhibit biofilm formation. Journal of Dentistry 2014;42(11):1464-1472.
- 73. Jazayeri HE, Rodriguez-Romero M, Razavi M, Tahriri M, Ganjawalla K, Rasoulianboroujeni M, Malekoshoaraie MH, Khoshroo K, Tayebi L. The cross-disciplinary emergence of 3D printed bioceramic scaffolds in orthopedic bioengineering. Ceramics International 2018;44(1):1-9.
- 74. Sai Nievethitha S, Subhapradha N, Saravanan D, Selvamurugan N, Tsai WB, Srinivasan N, Murugesan R, Moorthi A. Nanoceramics on osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. International Journal of Biological Macromolecules 2017;98:67-74.
- 75. Rizwan M, Hamdi M, Basirun WJ. Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2017;105(11):3197-3223.
- 76. Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. Acta Biomaterialia 2015;23(S):S53-S82.
- 77. Lasgorceix M, Champion E, Chartier T. Shaping by microstereolithography and sintering of macro-micro-porous silicon substituted hydroxyapatite. Journal of the European Ceramic Society 2016;36(4):1091-1101.
- 78. Brie J, Chartier T, Chaput C, Delage C, Pradeau B, Caire F, Boncoeur M-P, Moreau J-J. A new custom made bioceramic implant for the repair of large and complex craniofacial bone defects. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 2013;41(5):403-407.
- 79. Seol YJ, Park DY, Park JY, Kim SW, Park SJ, Cho DW. A new method of fabricating robust freeform 3D ceramic scaffolds for bone tissue regeneration. Biotechnology and Bioengineering 2013;110(5):1444-1455.
- 80. Zhao F, Zhang W, Fu X, Xie W, Chen X. Fabrication and characterization of bioactive glass/alginate composite scaffolds by a self-crosslinking processing for bone regeneration. RSC Advances 2016;6(94):91201-91208.



- 81. Shuai C, Cao Y, Gao C, Feng P, Xiao T, Peng S. Hydroxyapatite whisker reinforced 63s glass scaffolds for bone tissue engineering. BioMed Research International 2015;2015.
- 82. Liu J, Gao C, Feng P, Peng S, Shuai C. Selective laser sintering of B-TCP/nano-58S composite scaffolds with improved mechanical properties. Materials & Design 2015;84:395-401.
- Shuai C, Zhuang J, Hu H, Peng S, Liu D, Liu J. In vitro bioactivity and 83. degradability of B-tricalcium phosphate porous scaffold fabricated via selective laser sintering. Biotechnology and Applied Biochemistry 2013;60(2):266-273.
- 84. Vella JB, Trombetta RP, Hoffman MD, Inzana J, Awad H, Benoit DSW. Three dimensional printed calcium phosphate and poly(caprolactone) composites with improved mechanical properties and preserved microstructure. Journal of Biomedical Materials Research - Part A 2018;106(3):663-672.
- 85. Gyles DA, Castro LD, Silva JOC, Jr., Ribeiro-Costa RM. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. European Polymer Journal 2017;88:373-392.
- 86. Hunt NC, Grover LM. Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. Biotechnology Letters 2010;32(6):733-742.
- 87. Kumar A, Rao KM, Han SS. Synthesis of mechanically stiff and bioactive hybrid hydrogels for bone tissue engineering applications. Chemical Engineering Journal 2017;317:119-131.
- Wang XF, Lu PJ, Song Y, Sun YC, Wang YG, Wang Y. Nano hydroxyapatite 88. particles promote osteogenesis in a three-dimensional bio-printing construct consisting of alginate/gelatin/hASCs. RSC Advances 2016;6(8):6832-6842.
- 89. Morelli S, Salerno S, Holopainen J, Ritala M, De Bartolo L. Osteogenic and osteoclastogenic differentiation of co-cultured cells in polylactic acidnanohydroxyapatite fiber scaffolds. Journal of Biotechnology 2015;204:53-62.
- Wang M, Favi P, Cheng X, Golshan NH, Ziemer KS, Keidar M, Webster TJ. Cold 90. atmospheric plasma (CAP) surface nanomodified 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds for bone regeneration. Acta Biomaterialia 2016;46:256-265.
- Gregor A, Filová E, Novák M, Kronek J, Chlup H, Buzgo M, Blahnová V, Lukášová 91. V, Bartoš M, Nečas A and others. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. Journal of Biological Engineering 2017;11(1).
- 92. Zhang L, Jin AM, Guo ZM, Min SX, Quan DP, Lu ZJ. Effect of pore size of D, Lpolylactic acid as bone repair material on bone regeneration. Di 1 jun yi da xue xue bao = Academic journal of the first medical college of PLA 2002;22(5):423-426.
- 93. Rossi F, Santoro M, Perale G. Polymeric scaffolds as stem cell carriers in bone repair. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2015;9(10):1093-1119.
- 94. Ródenas-Rochina J, Ribelles JLG, Lebourg M. Comparative study of PCL-HAp and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2013;24(5):1293-1308.
- 95. Torres E, Fombuena V, Vallés-Lluch A, Ellingham T. Improvement of mechanical and biological properties of Polycaprolactone loaded with Hydroxyapatite and Halloysite nanotubes. Materials Science and Engineering: C 2017;75:418-424.



- 96. Song J, Gao H, Zhu G, Cao X, Shi X, Wang Y. The preparation and characterization of polycaprolactone/graphene oxide biocomposite nanofiber scaffolds and their application for directing cell behaviors. Carbon 2015;95:1039-1050.
- 97. Luo J, Zhang H, zhu J, Cui X, Gao J, Wang X, Xiong J. 3-D mineralized silk fibroin/polycaprolactone composite scaffold modified with polyglutamate conjugated with BMP-2 peptide for bone tissue engineering. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2018;163:369-378.
- 98. Lin YH, Chiu YC, Shen YF, Wu YHA, Shie MY. Bioactive calcium silicate/poly-ε-caprolactone composite scaffolds 3D printed under mild conditions for bone tissue engineering. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2018;29(1).
- 99. Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, Ng KW, Teoh SH, Tan KC. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. Journal of Biomedical Materials Research 2001;55(2):203-216.
- 100. Biscaia S, Dabrowska E, Tojeira A, Horta J, Carreira P, Morouço P, Mateus A, Alves N. Development of Heterogeneous Structures with Polycaprolactone-Alginate Using a New 3D Printing System BioMED<inf>Beta</inf>: Design and Processing. Procedia Manufacturing 2017;12:113-119.
- 101. Fedore CW, Tse LYL, Nam HK, Barton KL, Hatch NE. Analysis of polycaprolactone scaffolds fabricated via precision extrusion deposition for control of craniofacial tissue mineralization. Orthodontics and Craniofacial Research 2017;20:12-17.
- 102. Shor L, Güçeri S, Sun W. Precision extrusion deposition of polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds. 2006. p 96-101.
- 103. Houben A, Pien N, Lu X, Bisi F, Van Hoorick J, Boone MN, Roose P, Van den Bergen H, Bontinck D, Bowden T and others. Indirect Solid Freeform Fabrication of an Initiator-Free Photocrosslinkable Hydrogel Precursor for the Creation of Porous Scaffolds. Macromolecular Bioscience 2016;16(12):1883-1894.
- 104. Nyberg E, Rindone A, Dorafshar A, Grayson WL. Comparison of 3D-Printed Poly
  ε-Caprolactone Scaffolds Functionalized with Tricalcium Phosphate,
  Hydroxyapatite, Bio-Oss, or Decellularized Bone Matrix. Tissue Engineering Part A 2017;23(11-12):503-514.
- 105. Park J, Lee SJ, Jo HH, Lee JH, Kim WD, Lee JY, Park SA. Fabrication and characterization of 3D-printed bone-like B-tricalcium phosphate/polycaprolactone scaffolds for dental tissue engineering. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 2017;46:175-181.
- 106. Fu J, Yu X, Jin Y. 3D printing of vaginal rings with personalized shapes for controlled release of progesterone. International Journal of Pharmaceutics 2018;539(1):75-82.
- 107. Mazzoli A, Ferretti C, Gigante A, Salvolini E, Mattioli-Belmonte M. Selective laser sintering manufacturing of polycaprolactone bone scaffolds for applications in bone tissue engineering. Rapid Prototyping Journal 2015;21(4):386-392.
- 108. Williams JM, Adewunmi A, Schek RM, Flanagan CL, Krebsbach PH, Feinberg SE, Hollister SJ, Das S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. Biomaterials 2005;26(23):4817-4827.



- 109. Eosoly S, Brabazon D, Lohfeld S, Looney L. Selective laser sintering of hydroxyapatite/poly-\(\epsilon\)-\(\epsilon\) actone scaffolds. Acta Biomaterialia 2010;6(7):2511-2517.
- 110. Liao HT, Lee MY, Tsai WW, Wang HC, Lu WC. Osteogenesis of adipose-derived stem cells on polycaprolactone-B-tricalcium phosphate scaffold fabricated via selective laser sintering and surface coating with collagen type I. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2016;10(10):E337-E353.
- 111. Doyle H, Lohfeld S, McHugh P. Evaluating the effect of increasing ceramic content on the mechanical properties, material microstructure and degradation of selective laser sintered polycaprolactone/B-tricalcium phosphate materials. Medical Engineering and Physics 2015;37(8):767-776.
- 112. He Y, Tuck CJ, Prina E, Kilsby S, Christie SD, Edmondson S, Hague RJM, Rose FRAJ, Wildman RD. A new photocrosslinkable polycaprolactone-based ink for three-dimensional inkjet printing. Journal of Biomedical Materials Research -Part B Applied Biomaterials 2016.
- 113. Thomas S, Durand D, Chassenieux C, Jyotishkumar P. Handbook of biopolymerbased materials. From blends and composites to gels and complex networks. Germany: Wiley; 2013.
- 114. Lam CXF, Savalani MM, Teoh SH, Hutmacher DW. Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: Accelerated versus simulated physiological conditions. Biomedical Materials 2008;3(3).
- 115. Valdés A, Beltrán A, Mellinas AC, Garrigós C. Poly (ε-caprolactone) (PCL) Application in Biodegradable films and bags Green polymer composites technology. Properties and applications.: Inamuddin; 2016.
- Kweon H, Yoo MK, Park IK, Kim TH, Lee HC, Lee H-S, Oh J-S, Akaike T, Cho C-116. S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. Biomaterials 2003;24(5):801-808.
- Patrício T, Domingos M, Gloria A, D'Amora U, Coelho JF, Bártolo PJ. Fabrication 117. and characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue engineering. Rapid Prototyping Journal 2014;20(2):145-156.
- Zeng JH, Liu SW, Xiong L, Qiu P, Ding LH, Xiong SL, Li JT, Liao XG, Tang ZM. 118. Scaffolds for the repair of bone defects in clinical studies: A systematic review. Journal of Orthopaedic Surgery and Research 2018;13(1).
- Salgado CL, Grenho L, Fernandes MH, Colaço BJ, Monteiro FJ. Biodegradation, 119. biocompatibility, osteoconduction and evaluation collagennanohydroxyapatite cryogels for bone tissue regeneration. Journal of Biomedical Materials Research - Part A 2016;104(1):57-70.
- 120. Avila Rodríguez MI, Rodríguez Barroso LG, Sánchez ML. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. Journal of Cosmetic Dermatology 2018;17(1):20-26.
- Lin KF, He S, Song Y, Wang CM, Gao Y, Li JQ, Tang P, Wang Z, Bi L, Pei GX. 121. Low-Temperature Additive Manufacturing of Biomimic Three-Dimensional Hydroxyapatite/Collagen Scaffolds for Bone Regeneration. ACS Applied Materials and Interfaces 2016;8(11):6905-6916.
- Echave MC, Sánchez P, Pedraz JL, Orive G. Progress of gelatin-based 3D 122. approaches for bone regeneration. Journal of Drug Delivery Science and Technology 2017;42(Supplement C):63-74.



- 123. Jelen C, Mattei G, Montemurro F, De Maria C, Mattioli-Belmonte M, Vozzi G. Bone scaffolds with homogeneous and discrete gradient mechanical properties. Materials Science and Engineering: C 2013;33(1):28-36.
- 124. Chae T, Yang H, Leung V, Ko F, Troczynski T. Novel biomimetic hydroxyapatite/alginate nanocomposite fibrous scaffolds for bone tissue regeneration. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2013;24(8):1885-1894.
- 125. Balagangadharan K, Dhivya S, Selvamurugan N. Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering. International Journal of Biological Macromolecules 2017;104:1372-1382.
- 126. Koosha M, Mirzadeh H. Electrospinning, mechanical properties, and cell behavior study of chitosan/PVA nanofibers. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2015;103(9):3081-3093.
- 127. Duan B, Wu L, Yuan X, Hu Z, Li X, Zhang Y, Yao K, Wang M. Hybrid nanofibrous membranes of PLGA/chitosan fabricated via an electrospinning array. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2007;83(3):868-878.
- 128. Wang B, Liu W, Xing D, Li R, Lv C, Li Y, Yan X, Ke Y, Xu Y, Du Y and others. Injectable nanohydroxyapatite-chitosan-gelatin micro-scaffolds induce regeneration of knee subchondral bone lesions. Scientific Reports 2017;7(1).
- 129. Aldrich S. Cellulose-microcrystalline, powder Datasheet.
- 130. Trache D, Hussin MH, Hui Chuin CT, Sabar S, Fazita MRN, Taiwo OFA, Hassan TM, Haafiz MKM. Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and biocomposites application—A review. International Journal of Biological Macromolecules 2016;93:789-804.
- 131. Jia B, Li Y, Yang B, Xiao D, Zhang S, Rajulu AV, Kondo T, Zhang L, Zhou J. Effect of microcrystal cellulose and cellulose whisker on biocompatibility of cellulose-based electrospun scaffolds. Cellulose 2013;20(4):1911-1923.
- 132. Courtenay JC, Johns MA, Galembeck F, Deneke C, Lanzoni EM, Costa CA, Scott JL, Sharma RI. Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering. Cellulose 2017;24(1):253-267.
- 133. Izzati Zulkifli N, Samat N, Anuar H, Zainuddin N. Mechanical properties and failure modes of recycled polypropylene/microcrystalline cellulose composites. Materials and Design 2015;69:114-123.
- 134. Haafiz MKM, Hassan A, Zakaria Z, Inuwa IM, Islam MS, Jawaid M. Properties of polylactic acid composites reinforced with oil palm biomass microcrystalline cellulose. Carbohydrate Polymers 2013;98(1):139-145.
- 135. Pasqui D, Torricelli P, De Cagna M, Fini M, Barbucci R. Carboxymethyl cellulose Hydroxyapatite hybrid hydrogel as a composite material for bone tissue engineering applications. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2014;102(5):1568-1579.
- 136. Odabas S. Collagen-carboxymethyl cellulose-tricalcium phosphate multilamellar cryogels for tissue engineering applications: Production and characterization. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 2016;31(4):411-422.
- 137. Singh BN, Panda NN, Mund R, Pramanik K. Carboxymethyl cellulose enables silk fibroin nanofibrous scaffold with enhanced biomimetic potential for bone tissue engineering application. Carbohydrate Polymers 2016;151:335-347.



- Liu P, Chen D, Shi J. Chemical constituents, biological activity and agricultural 138. cultivation of Aloe vera. Asian Journal of Chemistry 2013;25(12):6477-6485.
- Moreno Vega A, López Gálvez MY, Jiménez Álvarez L. Aloe vera. Sábila. Cultivo 139. y utilización.; 2012.
- Zacatecas-Ibañez J, Ramírez-Camacho E, Candelas-Cadillo M, Rodríguez-140. González V, Femenia A, Minjares-Fuentes R, Sáenz-Esqueda M. Contenido de polisacáridos bioactivos de Aloe Barbadensis Miller bajo condiciones de estrés. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos 2016;1(2):776-781.
- 141. Hamman JH. Composition and applications of Aloe vera leaf gel. Molecules 2008;13(8):1599-1616.
- 142. Chantarawaratit P, Sangvanich P, Banlunara W, Soontornvipart K, Thunyakitpisal P. Acemannan sponges stimulate alveolar bone, cementum and periodontal ligament regeneration in a canine class II furcation defect model. Journal of Periodontal Research 2014;49(2):164-178.
- 143. Boonyagul S, Thunyakitpisal P, Tachaboonyakiat W. Physical properties and biocompatibility of acemannan scaffold for biomedical applications. 2015.
- Shanmugavel S, Reddy VJ, Ramakrishna S, Lakshmi BS, Dev VG. Precipitation of 144. hydroxyapatite on electrospun polycaprolactone/aloe vera/silk fibroin nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. Journal of Biomaterials Applications 2014;29(1):46-58.
- Godoy DJD, Chokboribal J, Pauwels R, Banlunara W, Sangvanich P, Jaroenporn 145. S, Thunyakitpisal P. Acemannan increased bone surface, bone volume, and bone density in a calvarial defect model in skeletally-mature rats. Journal of Dental Sciences 2018.
- 146. Liu X, Won Y, Ma PX. Surface modification of interconnected porous scaffolds. Journal of Biomedical Materials Research - Part A 2005;74(1):84-91.
- Peña J, Corrales T, Izquierdo-Barba I, Serrano MC, Portolés MT, Pagani R, 147. Vallet-Regí M. Alkaline-treated poly(ε-caprolactone) films: Degradation in the presence or absence of fibroblasts. Journal of Biomedical Materials Research -Part A 2006;76(4):788-797.
- 148. Uppanan P, Thavornyutikarn B, Kosorn W, Kaewkong P, Janvikul W. Enhancement of chondrocyte proliferation, distribution, and functions within polycaprolactone scaffolds by surface treatments. Journal of Biomedical Materials Research - Part A 2015;103(7):2322-2332.
- Ho MH, Lee JJ, Fan SC, Wang DM, Hou LT, Hsieh HJ, Lai JY. Efficient 149. modification on PLLA by ozone treatment for biomedical applications. Macromolecular Bioscience 2007;7(4):467-474.
- Darain F, Chan WY, Chian KS. Performance of surface-modified 150. polycaprolactone on growth factor binding, release, and proliferation of smooth muscle cells. Soft Materials 2011;9(1):64-78.
- 151. Yoshida S, Hagiwara K, Hasebe T, Hotta A. Surface modification of polymers by plasma treatments for the enhancement of biocompatibility and controlled drug release. Surface and Coatings Technology 2013;233:99-107.
- 152. Sardella E, Fisher ER, Shearer JC, Garzia Trulli M, Gristina R, Favia P. N<inf&gt;2&lt;/inf&gt;/H&lt;inf&gt;2&lt;/inf&gt;o plasma assisted functionalization of poly(ε-caprolactone) porous scaffolds: Acidic/basic character versus cell behavior. Plasma Processes and Polymers 2015;12(8):786-798.



- 153. Sousa I, Mendes A, Pereira RF, Bártolo PJ. Collagen surface modified poly(ε-caprolactone) scaffolds with improved hydrophilicity and cell adhesion properties. Materials Letters 2014;134:263-267.
- 154. Wang M, Cheng X, Zhu W, Holmes B, Keidar M, Zhang LG. Design of biomimetic and bioactive cold plasma-modified nanostructured scaffolds for enhanced osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Tissue Engineering Part A 2014;20(5-6):1060-1071.
- 155. Suntornnond R, An J, Chua CK. Effect of gas plasma on polycaprolactone (PCL) membrane wettability and collagen type i immobilized for enhancing cell proliferation. Materials Letters 2016;171:293-296.
- 156. Can-Herrera LA, Ávila-Ortega A, de la Rosa-García S, Oliva AI, Cauich-Rodríguez JV, Cervantes-Uc JM. Surface modification of electrospun polycaprolactone microfibers by air plasma treatment: Effect of plasma power and treatment time. European Polymer Journal 2016;84:502-513.
- 157. Bak TY, Kook MS, Jung SC, Kim BH. Biological effect of gas plasma treatment on CO2 gas foaming/salt leaching fabricated porous polycaprolactone scaffolds in bone tissue engineering. Journal of Nanomaterials 2014;2014.
- 158. Recek N, Resnik M, Motaln H, Lah-Turnšek T, Augustine R, Kalarikkal N, Thomas S, Mozetič M. Cell Adhesion on Polycaprolactone Modified by Plasma Treatment. International Journal of Polymer Science 2016;2016.
- 159. Domingos M, Intranuovo F, Gloria A, Gristina R, Ambrosio L, Bártolo PJ, Favia P. Improved osteoblast cell affinity on plasma-modified 3-D extruded PCL scaffolds. Acta Biomaterialia 2013;9(4):5997-6005.
- 160. Sahapaibounkit P, Prasertsung I, Mongkolnavin R, Wong CS, Damrongsakkul S. A two-step method using air plasma and carbodiimide crosslinking to enhance the biocompatibility of polycaprolactone. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials 2017;105(6):1658-1666.



# 2.9. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de autoinjertos de tejidos soportados en $\mathit{scaffolds.}^3$ .	5
Figura 2. Ejemplos de modelos CAD para estructuras scaffold <sup>14</sup>	8
Figura 3. Esquema del proceso seguido para la fabricación de prótesis mediant	e
fabricación aditiva.15	8
Figura 4. Esquema básico de un equipo de estereolitografía. 20	9
Figura 5. Esquema básico de un equipo de sinterizado láser1	0
Figura 6. Scaffold de PCL Osteoplug $^{TM}$ e implantación quirúrgica del mismo1	2
Figura 7. Esqueleto humano. 33	3
Figura 8. Organización de la matriz extracelular. 361	4
Figura 9. Esquema de las diferentes células óseas1	4
Figura 10. Características básicas del osteoblasto. 38	5
Figura 11. Esquema de distribución del tipo de tejido óseo en un hueso largo. 431	7
Figura 12. Esquema del proceso de electrospinning. 49	8
Figura 13. Estratificación de tejidos en unidades osteocondrales. <sup>59</sup> 2	0
Figura 14. Esquema de estructura multicapa de un scaffold para regeneración d	e
lesiones osteocondrales. 62	0
Figura 15. Esquema de los principales materiales poliméricos empleados en l	а.
fabricación de estructuras para la regeneración de tejido óseo2	4
Figura 16. Estructura química del ácido poliláctico2	5
Figura 17. Estructura química del ácido poliglicólico2	6
Figura 18. Estructura química del monómero de policaprolactona2	6
Figura 19. Reacción de hidrólisis de la policaprolactona. 115	9
Figura 20. Estructura química del alginato de calcio	1
Figura 21. Estructura química del quitosano3	2
Figura 22. Estructura de las unidades monoméricas de la celulosa microcristalina. $^{129}\dots 3$	3
Figura 23. Esquema del proceso de obtención de la celulosa microcristalina a partir d	
fibras de celulosa. <sup>130</sup> 3	3
Figura 24. Estructura química de la carboximetilcelulosa de sodio3	5
Figura 25. Planta de Aloe Vera3	6
Figura 26. Detalle hoja de Aloe Vera3	6
Figura 27. Proceso de recubrimiento de scaffolds de policaprolactona con colágen	
mediante activación con plasma. 153	0



# 2.10. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades mecánicas del hueso cortical humano bajo diferentes tipos de
carga. <sup>42</sup> 16
Tabla 2. Relación de técnicas de fabricación que han sido empleadas en la obtención
de estructuras soporte en base ácido poliláctico25
Tabla 3. Materiales composite en base policaprolactona propuestos en el estado del
arte27
Tabla 4. Valores de temperatura utilizados para la deposición por extrusión térmica de
estructuras tridimensionales basadas en policaprolactona
Tabla 5. Principales productores de Aloe Vera (datos de 2004-2011). 139
Tabla 6. Ejemplo de modificaciones superficiales sobre estructuras de polímeros
sintéticos para la mejora de sus propiedades en ingeniería de tejidos39
Tabla 7. Gases empleados en estudios previos para la funcionalización de superficies
de policaprolactona mediante tratamiento con plasma41
Tabla 8. Estudios previos en los que el tratamiento con plasma es utilizado para la
inmovilización de sustancias bioactivas41



Capítulo 3. Formulación de materiales y métodos de caracterización.

# CONTENIDO

3.1. Introducción5	6
3.2. Preparación de materiales composites5	57
3.3. Propiedades de flujo de las combinaciones de materiales propuestas5	59
3.3.1. Clasificación de los fluidos en función de su viscosidad5	59
3.3.2. Modelización del comportamiento de flujo6	0
3.3.2.1. Curvas de viscosidad6	0
3.3.2.2. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad6	1
3.3.2.3. Modelos de viscosidad6	2
3.3.3. Obtención de datos de viscosidad6	3
3.4. Métodos de caracterización de láminas de materiales composites6	9
3.4.1. Análisis termogravimétrico y calorimétrico6	9
3.4.2. Retención de fosfato tampón salino (PBS) y agua7	<b>7</b> 2
3.4.3. Medición del ángulo de contacto7	<b>7</b> 3
3.4.4. Análisis cualitativo de la distribución de partículas7	<b>7</b> 4
3.4.5. Espectroscopía infrarroja7	<b>7</b> 5
3.4.6. Difracción de Rayos X (DRX)7	<b>7</b> 6
3.4.7. Ensayos de tracción	<b>7</b> 8
3.4.8. Cultivo celular y evaluación de la proliferación celular7	<b>7</b> 8
3.5. Fabricación de estructuras tridimensionales de materiales composites7	79
3.6. Métodos de caracterización de estructuras tridimensionales de materiale composites	
3.6.1. Morfología	
3.6.1.1. Observación microscópica	
3.6.1.2. Observación en microCT8	
3.6.1.2. Porosidad8	35
3.6.2. Ensayos mecánicos	
3.6.2.1. Ensayo de compresión	36
3.6.2.2. Ensayo de flexión en tres puntos8	37
3.6.3. Cultivo celular y evaluación de la proliferación celular8	38
3.7. Análisis estadístico8	39
3.8. Tratamiento superficial de muestras de policaprolactona8	39
3.8.1. Procedimiento de recubrimiento con extracto de aloe vera9	
3.8.2. Fabricación de estructuras tridimensionales para posterior tratamient superficial	

3.9. Caracterización química de las superficies	92
3.9.1. Espectroscopía infrarroja	92
3.9.2. Método de la toluidina	92
3.9.3. Medición del ángulo de contacto	93
3.9.4. Análisis elemental por energía dispersiva de rayos X	94
3.10. Evaluación biológica del efecto de los tratamientos superficiales	95
3.10.1. Cultivo celular	95
3.10.2. Determinación de la viabilidad celular	96
3.10.3. Tinción células vivas/células muertas	97
3.11. Conclusiones	98
3.12. Referencias	100
3.13. Índice de figuras	103
3.14. Índice de tablas	105

# 3.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se explica, en primer lugar, la metodología seguida para la obtención de material composite utilizando policaprolactona como matriz y dos componentes celulósicos (celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa) como aditivos. Se define, además, el procedimiento seguido para evaluar las propiedades de flujo de estos composites y obtener los modelos de viscosidad que permiten correlacionar esta propiedad con la temperatura y velocidad de cizalla a las que se sometan los materiales durante su procesado térmico.

A continuación se incluye la descripción de los métodos de caracterización utilizados para evaluar las propiedades de diferentes formulaciones de material composite obtenidas mediante moldeo por compresión: análisis termogravimétrico y calorimétrico, cuantificación de la retención de fosfato salino y agua, medición del ángulo de contacto, análisis cualitativo de la distribución de partículas, estudio de su espectro infrarrojo, análisis del patrón de difracción de rayos X, determinación de las propiedades mecánicas a tracción y evaluación biológica.

Posteriormente, se detalla el procedimiento empleado para la obtención de estructuras tridimensionales con estas formulaciones mediante fabricación aditiva y los ensayos empleados para verificar la utilidad de estas piezas como estructuras soporte para la regeneración ósea (morfología, propiedades mecánicas y afinidad celular evaluada a través de ensayos in vitro).

Por otra parte, en una segunda sección del capítulo se especifican las técnicas de modificación superficial empleadas para mejorar las propiedades de estructuras de base policaprolactona. Estas técnicas se basan en una primera etapa de tratamiento con plasma y una segunda fase de recubrimiento con extracto de aloe vera. Además del procedimiento seguido para realizar este recubrimiento, se describen las técnicas que se han empleado para caracterizar el efecto de estos tratamientos sobre las características químicas de la superficie de la policaprolactona (mediante espectroscopía infrarroja, determinación de la concentración superficial de grupos carboxilo mediante el método de la toluidina y análisis elemental por energía dispersiva de rayos X), así como sobre su bioafinidad (evaluado a través de ensayos in vitro).



## 3.2. PREPARACIÓN DE MATERIALES COMPOSITES

La obtención de material composite se realizó utilizando el moldeo por compresión con una mezcla homogénea de polvo de policaprolactona y la cantidad correspondiente de aditivo celulósico. La policaprolactona utilizada (Capa® 6800, Perstorp) tiene un formato comercial granular, por lo que se llevó a cabo un proceso de molienda utilizando un molino ultracentrífugo ZM200 Retsch (Figura 1 y Figura 2) a una velocidad de giro de 8000 rpm.



Figura 1. Exterior molino ultracentrífugo ZM200.





Figura 2. Interior molino ultracentrífugo ZM200.

Por su parte, tanto la celulosa microcristalina como la carboximetilcelulosa presentan un formato de polvo fino que no requiere de tratamiento previo a la mezcla con el polvo de policaprolactona.

El ciclo de moldeo por compresión utilizado consiste en efectuar un calentamiento de la mezcla, hasta 85°C, a una velocidad de 20°C/min. Dicha temperatura se mantiene entonces fija durante 2 minutos y posteriormente se produce un enfriamiento a 20°C/min. Todo el ciclo se realizó a una presión constante de 10 bar. El equipo que se ha utilizado para este proceso es una prensa de platos calientes, modelo P 200 P/M, de Collin (Figura 3).





Figura 3. Prensa P 200 P/M Collin (izquierda) y detalle del interior de la máquina de compresión con mezcla PCL:CMC 95:5 antes del ciclo de calentamiento (derecha).

La lámina así obtenida se tritura y se repite el ciclo de moldeo por compresión a fin de asegurar la homogeneidad en la distribución de las partículas de material celulósico. Esta segunda lámina se tritura nuevamente, obteniéndose pellets de material composite de la composición deseada, que son los que se emplearán para la producción de las muestras de estudio.

En la Tabla 1 se especifican las combinaciones de materiales que se han formulado para alguna fase de ensayo. Cabe destacar que no todas estas combinaciones han sido utilizadas para la fabricación de estructuras tridimensionales, tal como se describirá en sucesivos capítulos, pero sí han sido empleadas para la caracterización del material.

Código	Componente celulósico utilizado	Concentración de componente celulósico (p/p)
PCL	Sin aditivo	0%
PCL:CMC 98:2	Carboximetilcelulosa de sodio	2%
PCL:CMC 95:5	Carboximetilcelulosa de sodio	5%
PCL:CMC 90:10	Carboximetilcelulosa de sodio	10%
PCL:CMC 80:20	Carboximetilcelulosa de sodio	20%
PCL:MCC 98:2	Celulosa microcristalina	2%
PCL:MCC 95:5	Celulosa microcristalina	5%
PCL:MCC 90:10	Celulosa microcristalina	10%
PCL:MCC 80:20	Celulosa microcristalina	20%

Tabla 1. Codificación y descripción de las formulaciones de material composite propuestas.

La policaprolactona utilizada en todas las formulaciones fue Capa® 6800, con un peso molecular promedio de 80000 Da, una temperatura de fusión de entre 58 y 60°C y un índice de fluidez de 4,03-2,01 g/10 min de acuerdo con las especificaciones de la ficha técnica suministrada por el proveedor (Perstorp). Por su parte, la carboximetilcelulosa (Sigma Aldrich) tiene un peso molecular de 90000 Da y un grado de sustitución 0,7 grupos carboximetil por anhidroglucosa. La celulosa microcristalina empleada (Sigma Aldrich) tiene un tamaño de partícula promedio de 51 µm y una densidad de 0,6 g/cm<sup>3</sup>.



# 3.3. PROPIEDADES DE FLUJO DE LAS COMBINACIONES DE MATERIALES PROPUESTAS

La determinación de las propiedades de flujo es de vital importancia para el diseño de equipos de procesado de materiales poliméricos, así como para optimizar las condiciones de operación.

Uno de los parámetros fundamentales a analizar en este tipo de caracterización es la viscosidad. La viscosidad es un parámetro físico de los fluidos que cuantifica su resistencia al movimiento y se define como la relación entre la tensión de corte aplicada sobre un elemento diferencial del mismo y la velocidad de cizalla generada como consecuencia de la aplicación de este esfuerzo en la dirección del flujo.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Donde:

 $\eta = viscosidad$ 

 $\tau$  =tensión de cizalla

 $\dot{\gamma}$  = velocidad de cizalla

A nivel molecular, la viscosidad es una medida de la fricción existente entre las partículas que componen el fluido, dado que cuanto mayor sea esta, más energía será necesario invertir para imprimir una cierta velocidad al flujo. De esta forma, es evidente que la estructura química del fluido analizado influirá de forma determinante sobre su viscosidad.

## 3.3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS FLUIDOS EN FUNCIÓN DE SU VISCOSIDAD

La dependencia de la viscosidad con respecto a la velocidad de cizalla permite clasificar los fluidos en newtonianos y no newtonianos. Así, se califica a un material como fluido newtoniano cuando la viscosidad es constante a una presión y temperatura dadas y no newtoniano cuando existe una dependencia entre viscosidad y velocidad de cizalla.

Los termoplásticos son materiales típicamente no newtonianos, ya que la velocidad de cizalla aplicada influye sobre el desplazamiento entre las cadenas macromoleculares y, en consecuencia, en la viscosidad del material.

Los fluidos no newtonianos pueden clasificarse, a su vez, como dilatantes o pseudoplásticos, de acuerdo con si la función que modeliza la dependencia entre viscosidad y velocidad de cizalla es creciente o decreciente, respectivamente (Figura 4). Una gran cantidad de suspensiones, emulsiones y polímeros fundidos de interés industrial muestran carácter pseudoplástico. La pseudoplasticidad de los polímeros puede explicarse teniendo en cuenta que una mayor velocidad de cizalla contribuye a desenmarañar las cadenas, lo que supone un incremento de la facilidad de movimiento relativo entre ellas y, por tanto, una disminución de la resistencia al flujo.



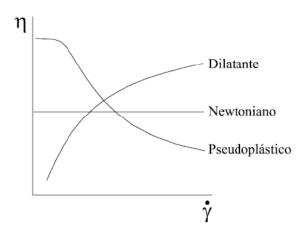


Figura 4. Curvas de flujo para distintos tipos de fluidos.

Existen ciertos materiales que empiezan a fluir sólo tras aplicarse sobre ellos una tensión de cizalla suficiente. En el caso de que el flujo que tiene lugar una vez se alcance ese punto sea de tipo newtoniano, este tipo de sustancias son conocidas como plásticos de Bingham.

## 3.3.2. MODELIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE FLUJO

Dada la importancia de la viscosidad como parámetro físico determinante para el diseño adecuado de procesos y equipos para el tratamiento y manufactura de cualquier material, se hace indispensable modelizar la dependencia de la viscosidad con la velocidad de cizalla a través de la obtención de las curvas y modelos de viscosidad. La curva de viscosidad es la representación de la función de viscosidadvelocidad de cizalla a una temperatura dada. A partir de varias curvas de flujo a diferentes temperaturas es posible obtener un modelo que tenga en cuenta no solo la dependencia de la viscosidad con la velocidad de cizalla, sino también con la temperatura, que es un parámetro determinante para caracterizar el comportamiento reológico del material.

#### 3.3.2.1. CURVAS DE VISCOSIDAD

Existen diversas expresiones para relacionar la dependencia de la viscosidad con la velocidad de cizalla en los fluidos no newtonianos. La más empleada es la ley potencial (también conocida como relación de Ostwald-de Waele), ya que presenta una formulación matemática simple a la vez que es capaz de modelizar el comportamiento de una amplia variedad de materiales.1

$$\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$$

Donde K y n son parámetros de la expresión, característicos de cada material y temperatura.

En algunos casos existe una región inicial (a bajas velocidades de cizalla) en la que el material tiene un comportamiento newtoniano para posteriormente dar lugar a un comportamiento pseudoplástico.



También es posible que sea necesaria la aplicación de una cierta tensión de cizalla inicial para el flujo del material, tal como ocurría en el caso de los plásticos de Bingham, pero que el comportamiento durante el flujo sea de tipo potencial. En este caso, el modelo más apropiado será el de Herschel-Bulkey.

$$\eta = \begin{cases} \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}} + K \cdot \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)^{n-1}, & \dot{\gamma} > \dot{\gamma}_c \\ \frac{\tau_0 \cdot \left(2 - \frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)}{\dot{\gamma}_c} + K \cdot \left[(2 - n) + (n - 1) \cdot \frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right], & \dot{\gamma} \leq \dot{\gamma}_c \end{cases}$$

Donde  $\dot{\gamma}_c$ es la velocidad de cizalla crítica a partir de la cual el comportamiento del flujo es de tipo potencial.

Existen otros modelos, como son el de Steiger-Ory<sup>2</sup> o el de Cross,<sup>3</sup> cuyas expresiones matemáticas respectivas se exponen a continuación:

$$\dot{\gamma} = a \cdot \tau^3 + c \cdot \tau$$

Donde a y c son parámetros del modelo.

$$\eta = \frac{\eta_0}{1 + \left(\frac{\eta_0 \cdot \dot{\gamma}}{\tau_0}\right)^{1-n}}$$

Siendo  $\eta_0$  la viscosidad del material a la temperatura T de la isoterma analizada y velocidad de cizalla nula.

## 3.3.2.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VISCOSIDAD

Tanto en los fluidos newtonianos como en los no newtonianos el incremento de la energía cinética molecular debido a un aumento de la temperatura provoca una disminución de las fuerzas intermoleculares y, por consiguiente, una reducción en la fricción interna durante el flujo.

Por consiguiente, un aumento de la temperatura implica una disminución de la viscosidad, siendo la expresión más habitual para modelizar dicha dependencia la ecuación de Arrhenius.

$$\eta = A \cdot \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right)$$

Donde:

A es una constante del modelo.

 $E_A$  es la energía de activación para el flujo, es decir, la cantidad de energía necesaria para crear una fracción de volumen libre que pueda ser ocupado por parte de la cadena polimérica, posibilitando así su desplazamiento en el seno del material.

R es la constante de los gases.



Esta expresión es adecuada para temperaturas superiores a la temperatura de transición vítrea.⁴

Una expresión más general es la de Williams, Landel y Ferry; que puede aplicarse en valores de temperatura próximos a la transición vítrea. Ésta se formula en términos generales para la determinación del factor de desplazamiento de los fluidos viscoelásticos. A partir de esta expresión, es posible obtener una relación entre viscosidad y temperatura.

$$\log(a_T) = -\frac{c_1^0(T - T_0)}{c_2^0 + T - T_0}$$

 $a_T$  es el factor de desplazamiento entre las distribuciones de tiempos de relajación a T y  $T_0$ .

T<sub>0</sub> es una temperatura de referencia. Habitualmente se toma como temperatura de referencia bien la temperatura de transición vítrea (en cuyo caso  $c_1^0$ = 17,44 y  $c_2^0$ =51,6),<sup>5</sup> bien T<sub>g</sub>+50°C (para este valor  $c_1^0$ = 8,86 y  $c_2^0$ =101,6). Estos valores pueden ser considerados como universales como aproximación suficiente.<sup>6</sup>

#### 3.3.2.3. MODELOS DE VISCOSIDAD

Tal como se ha expresado con anterioridad, las curvas de viscosidad son capaces de relacionar la viscosidad con la velocidad de cizalla a una temperatura fija. No obstante, es importante a nivel práctico disponer de modelos matemáticos que consideren de forma simultánea también la dependencia con la temperatura.

A continuación se exponen brevemente la formulación y características principales de los dos modelos que se han empleado en este trabajo: el modelo exponencial y el de segundo orden.

# Modelo exponencial

La expresión más simple para modelizar el comportamiento reológico de un fluido cuya viscosidad a temperatura constante sigue una ley potencial es el modelo exponencial.7

$$\eta(T, \dot{\gamma}) = A \cdot \exp\left(\frac{T_0}{T}\right) \cdot \dot{\gamma}^{(n-1)}$$

Donde:

A y n son constantes del modelo

T es la temperatura de trabajo

 $T_o$  es un valor de referencia, tomándose generalmente la temperatura de transición vítrea



Existen modelos más complejos basados en éste, como pueden ser el Crossexponencial o el Carreau-exponencial.

# Modelo de segundo orden

Se trata de un modelo de carácter empírico con una formulación matemática simple consistente en la suma de varios términos dependientes del logaritmo de la velocidad de cizalla y la temperatura.

El modelo de segundo orden empleado por el software de simulación *Moldflow*, tiene la siguiente expresión.

$$\ln(\eta) = a + b \cdot \ln\dot{\gamma} + c \cdot T + d \cdot (\ln\dot{\gamma})^2 + e \cdot T \cdot \ln\dot{\gamma} + f \cdot T^2$$

Esta función suele presentar un buen ajuste a los datos experimentales, debido a que permite modelizar con bastante exactitud las siguientes características:

- Convergencia de las curvas isocinéticas al incrementar la temperatura.
- Convergencia de isotermas al aumentar la velocidad de cizalla.
- La tasa de aumento a la que la viscosidad disminuye al elevar la velocidad de cizalla.
- La tasa de aumento a la que la viscosidad disminuye con un incremento de la temperatura.

No obstante, al carecer de base teórica, puede dar lugar a un buen ajuste de datos no consistentes desde un punto de vista reológico, como puede ser un incremento de la viscosidad al aumentar la temperatura.<sup>8</sup>

#### 3.3.3. OBTENCIÓN DE DATOS DE VISCOSIDAD

La forma más habitual de obtener datos de viscosidad que permitan realizar un ajuste por regresión para obtener el modelo de viscosidad de un determinado material es utilizando reómetros. Estos equipos permiten obtener datos de viscosidad a diferentes velocidades de cizalla y valores de temperatura. Las mediciones en un reómetro pueden basarse bien en el flujo de Coutte, tal como ocurre en los reómetros rotacionales, o bien en el flujo de presión, como sucede en los reómetros capilares.

En los viscosímetros rotacionales, se mide el esfuerzo necesario para conseguir una determinada velocidad entre dos superficies entre las cuales se sitúa el fluido cuya viscosidad pretende determinarse. Existen diferentes tipos de reómetros rotacionales según la geometría de las placas en contacto con el fluido: de cilindros concéntricos, de placas paralelas y de cono y plato (Figura 5).



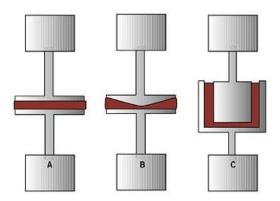


Figura 5. Esquema de reómetros rotacionales: placas paraleleas (A), cono y plato (B), cilindros concéntricos (C)

Por su parte, en los reómetros capilares se mide la presión que es necesario aplicar sobre el fluido para extruir un determinado caudal a través de un capilar de dimensiones conocidas (Figura 6).

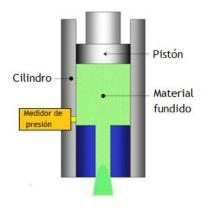


Figura 6. Esquema de reómetro capilar.

En general, los reómetros rotacionales tienen una mayor flexibilidad de uso y un manejo más simple. Por su parte, los reómetros capilares ofrecen una mayor precisión a bajas velocidades y gradientes de velocidad altos.9

El dispositivo experimental empleado en el presente estudio es de geometría muy similar a la de los reómetros capilares comerciales. Por esta razón se explica a continuación con mayor detalle cómo se realiza la caracterización reológica en este tipo de equipos, así como las diferencias que es necesario incluir para obtener resultados equiparables con el diseño propuesto.

El reómetro capilar es uno de los dispositivos más empleados en la determinación de la viscosidad de polímeros. Para la aplicación de esta técnica, el método estándar más seguido es el descrito por la ISO 11443:2005.



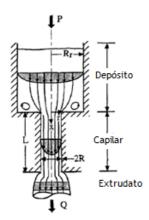


Figura 7. Esquema de líneas de flujo en el interior de un reómetro capilar.

Como se muestra en la Figura 7, este reómetro consta de un primer cilindro que sirve como depósito de almacenamiento de material y en el cual la caída de presión existente puede considerarse despreciable frente a la caída de presión que se produce posteriormente en el capilar, cuyo diámetro es significativamente menor.

La caída de presión en un capilar cilíndrico de dimensiones conocidas se relaciona con la viscosidad a través de la ecuación de Hagen-Poiseuille (desarrollada para fluidos newtonianos):

$$\mu = \frac{\pi R^4 \Delta P}{8QL}$$

Donde:

 $\mu$  es la viscosidad del fluido

R el radio del capilar

 $\Delta P$  la caída de presión a través del mismo

Q el flujo volumétrico

L la longitud del capilar

De esta forma, midiendo la caída de presión en el capilar es posible determinar la viscosidad del fluido que lo atraviesa.

Por su parte, la velocidad de cizalla se define como el gradiente de velocidad en la dirección radial:

$$\dot{\gamma} = \frac{du}{dr}$$

Para el caso ideal, la integración de esa ecuación diferencial da lugar a la siguiente expresión. Esta velocidad de cizalla se denomina aparente por no tener en cuenta los efectos que tiene sobre el flujo el hecho de que el fluido estudiado tenga carácter no newtoniano:



$$\dot{\gamma}_{ap} = \frac{4Q}{\pi R^3}$$

Con respecto a la tensión de cizalla, es posible determinar su valor partiendo de la ecuación del movimiento en el eje de avance del flujo de material a lo largo del cilindro (eje z) mediante la siguiente expresión:6

$$\rho \left( \frac{\delta u_z}{\delta t} + u_r \frac{\delta u_z}{\delta r} + \frac{u_\theta}{r} \frac{\delta u_z}{\delta \theta} + u_z \frac{\delta u_z}{\delta z} \right) = -\left[ \frac{1}{r} \frac{\delta}{\delta r} (r \pi_{rz}) + \frac{1}{r} \frac{\delta \pi_{\theta z}}{\delta \theta} + \frac{\delta \pi_{zz}}{\delta z} \right]$$

Donde ho es la densidad del fluido,  $u_r$ ,  $u_{ heta}$  y  $u_z$  son las componentes de la velocidad en coordenadas cilíndricas y  $\pi_{ij}$  es la componente ij del tensor de tensión, de tal forma que para el estado estacionario y flujo laminar en conducciones cilíndricas la expresión anterior queda reducida a:

$$\frac{1}{r}\frac{\delta}{\delta r}(r\pi_{rz}) = -\frac{\delta P}{\delta z}$$

Donde P es la presión, de manera que si el gradiente  $\frac{\delta P}{\delta z}$  permanece constante, la integración da como resultado:

$$\tau_{rz} = \frac{r\Delta P}{2L}$$

La tensión de cizalla de pared puede ser calculada teniendo en cuenta que en este caso r=R.

$$\tau_w = \frac{R\Delta P}{2L}$$

La geometría del reómetro capilar provoca que en el brusco cambio de sección entre ambos cilindros existan turbulencias que contribuyen en cierta medida a la caída de presión global que puede medirse experimentalmente. Por ello, el valor de tensión de cizalla definido ha de ser considerado aparente y, por tanto, ha de ser corregido para tener en cuenta la desviación del caso real frente al ideal.

$$\tau_{ap} = \frac{R\Delta P}{2L}$$

$$\tau_{co} = \frac{R\Delta P}{2(L + ER)}$$

Donde:

 $au_{ap}$  es la tensión de cizalla aparente

 $au_{co}$  es la tensión de cizalla corregida

E es el denominado factor de corrección de Bagley, el cual se define como la ordenada en el origen de la representación de la caída de presión frente a la relación L/D para diferentes geometrías de viscosímetro capilar (Figura 8).



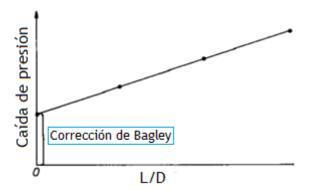


Figura 8. Representación gráfica del factor de corrección de Bagley.

Por otra parte, en las expresiones expuestas anteriormente no se ha tenido en consideración el carácter no newtoniano del fluido de trabajo. Por ello, es necesario establecer correcciones con la ecuación de Rabinowitsch-Mooney, la cual se deduce a partir de la ecuación de definición de flujo volumétrico en un conducto cilíndrico.

$$Q = 2\pi \int_0^R u \cdot r dr$$

El desarrollo de esta expresión teniendo en cuenta los efectos de superficie y para el caso de un radio suficientemente pequeño da como resultado la siguiente expresión, donde el subíndice w hace referencia a los parámetros de flujo de pared:<sup>6</sup>

$$\gamma_w = \frac{1}{4} \tau_w \frac{d[8(\langle u \rangle - u_w)/D]}{d\tau_w} + \frac{3}{4} \frac{8(\langle u \rangle - u_w)}{D}$$

Esta es la ecuación de Rabinowitsch-Mooney, que puede ser reordenada en términos de un parámetro característico, *b*:

$$\gamma_w = \left(\frac{3b+1}{4b}\right) \frac{8(\langle u \rangle - u_w)}{D}$$

$$b = \frac{dln\tau_w}{dln[8(\langle u \rangle - u_w)/D]}$$

De manera que b se identifica como la pendiente de la representación logarítmica de la tensión de cizalla de la pared frente a  $[8(\langle u \rangle - u_w)/D]$ , factor que puede identificarse como la velocidad de cizalla aparente definida con anterioridad. Por tanto:

$$b = \frac{dln\tau_w}{dln\dot{\gamma}_{ap}}$$

De esta forma, la viscosidad del fluido analizado se calcula como el cociente entre la tensión de cizalla corregida y la velocidad de cizalla corregida:

$$\eta_{co} = \frac{\tau_{co}}{\dot{\gamma}_{co}}$$

En este trabajo se han obtenido datos de viscosidad de las diferentes formulaciones propuestas siguiendo un método de trabajo definido en un estudio



preliminar a la presente tesis doctoral. 10 Para ello, se ha empleado un dispositivo de extrusión (Figura 9) muy similar a un reómetro capilar convencional, con la peculiaridad de que existe una transición cónica entre el cilindro de almacenamiento y la boquilla, lo que disminuye la caída de presión asociada al cambio de sección entre ambos cilindros y hace que el factor de corrección de Bagley pueda ser considerado despreciable.

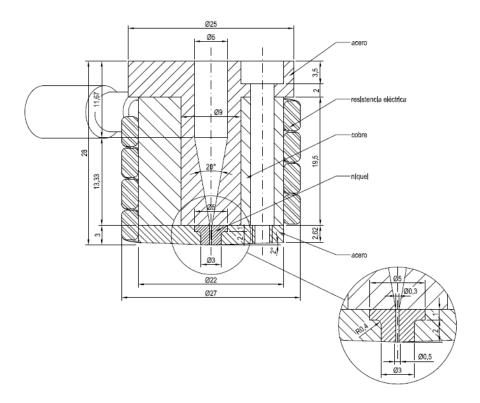


Figura 9. Alzado del dispositivo de extrusión empleado para la caracterización de las propiedades de flujo de los materiales empleados.

Este cilindro se encuentra calefactado con una resistencia eléctrica y su movimiento se dirige mediante control numérico, registrando la fuerza necesaria para llevar a cabo la extrusión de material con una célula de carga PCE-FG1k. Con los valores de fuerza se puede determinar la presión a la que se encuentra sometido el fundido polimérico durante su extrusión. Aplicando las expresiones anteriormente descritas para un reómetro capilar, así como la corrección de Rabinowitsch-Mooney sobre estos datos, es posible determinar los valores de viscosidad bajo diferentes condiciones de velocidad de cizalla y temperatura y, por consiguiente, determinar los modelos de viscosidad de cada uno de los composites propuestos en este trabajo.

Las velocidades de bajada de pistón empleadas fueron de entre 4 y 180 mm/min, lo que se corresponde con valores de velocidad de cizalla aparentes comprendidos entre 500 y 22000 s<sup>-1</sup>.

En cuanto a la selección de las temperaturas evaluadas, se tomó como referencia un trabajo previo del grupo de investigación en el que se realizó la caracterización de la policaprolactona entre 145°C y 170°C. 10 Sin embargo, las pruebas iniciales en la máquina de fabricación aditiva mediante extrusión térmica con material



composite mostraron que era conveniente incrementar la temperatura de trabajo para llevar a cabo un proceso de deposición adecuado, por lo cual se toma el valor superior de ese estudio previo (170°C) como límite inferior para la caracterización reológica de los materiales propuestos en este trabajo. En este sentido, tal como se desarrolla en apartados posteriores de este capítulo (3.5. Fabricación de estructuras tridimensionales de materiales composites), los ensayos de fabricación de *scaffolds* previos mostraron que la temperatura de 210°C proporcionaba unas piezas impresas de mejores características morfológicas. Por ello, se hace necesario incluir esta temperatura dentro del rango de trabajo seleccionado.

Dado que la caracterización de las propiedades de flujo es aplicable a la simulación de otros tipos de técnicas de fabricación basadas en procesos térmicos diferentes a la impresión empleada en este trabajo, se tomó el rango de 170-210°C, tomando un tercer valor de 190°C para poder obtener una caracterización más completa del rango de valores de temperatura que se estima como adecuado para el procesado térmico de estos materiales. La temperatura de fusión de la policaprolactona se sitúa en torno a los 60°C, <sup>11</sup> mientras que su temperatura de máxima degradación es 430°C. Por consiguiente, el rango de caracterización de las propiedades de flujo seleccionado se sitúa en la ventana térmica admisible para el procesado de este material.

El empleo de tres temperaturas de trabajo permite obtener modelos que incluyan simultáneamente la dependencia de la viscosidad con la temperatura y la velocidad de cizalla. En este caso, se han utilizado para esta modelización las expresiones exponencial y de segundo orden, cuya formulación se ha explicado en apartados previos de este capítulo.

# 3.4. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE LÁMINAS DE MATERIALES COMPOSITES

Los siguientes apartados describen las propiedades de muestras de composites obtenidas mediante moldeo por compresión. Esta caracterización permite evaluar el material macizo para comparar los resultados obtenidos con los que se presentan posteriormente para las estructuras porosas obtenidas mediante fabricación aditiva. Esta comparación permitirá valorar el efecto del aditivo en la procesabilidad del material por este método de fabricación. Además, no es viable la ejecución de ciertas técnicas de caracterización (como la medición del ángulo de contacto o la obtención de los espectros en el infrarrojo) con piezas tridimensionales porosas, por lo que la caracterización de las láminas es la única forma de llevar a cabo este tipo de análisis.

#### 3.4.1. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO Y CALORIMÉTRICO

Un análisis térmico es todo aquel estudio que evalúa cómo se modifican las propiedades de una determinada muestra a lo largo de su calentamiento o enfriamiento.

Existen diferentes tipos de análisis térmicos según la propiedad que se evalúe: termogravimetría (cambios de masa), calorimetría diferencial de barrido (calor



absorbido/cedido por la muestra), análisis dinámico mecánico (cambios en los módulos de propiedades mecánicas), etc.

Dentro de los análisis térmicos, el estudio termogravimétrico de una muestra evalúa como cambia su masa cuando se somete a un ciclo térmico determinado. Este ciclo térmico puede consistir en una rampa de temperatura (ensayo dinámico) o en el mantenimiento de una temperatura constante durante un cierto período de tiempo (ensayo isotermo). El estudio termogravimétrico permite establecer los límites de estabilidad térmica del material, así como determinar los parámetros cinéticos de su proceso de degradación.

Para la realización de este tipo de análisis se utilizó una termobalanza capaz de registrar la variación de la masa a lo largo del tiempo de duración del ensayo (Figura 10).

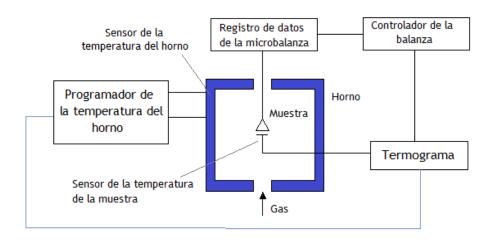


Figura 10. Diagrama de funcionamiento de una termobalanza.

Durante la realización de un ensayo térmico es necesario utilizar un gas de purga a fin de evacuar de la atmósfera de medición los productos de degradación que hayan podido generarse. 12 El tipo de gas de purga influirá sobre el proceso de degradación, siendo los gases más empleados en este tipo de análisis el aire y el nitrógeno. El nitrógeno es el gas que se utiliza más frecuentemente como inerte, ya que tiene escasa reactividad para un amplio rango de condiciones y materiales. Además, tiene una ventaja adicional sobre el otro gas inerte más empleado (el helio): tiene una conductividad térmica muy similar a la del aire y, por tanto, es necesario un período de tiempo más corto para alcanzar el equilibrio tras la apertura del horno al ambiente para cargar la muestra. 12

En este estudio, la caracterización de las propiedades térmicas de las combinaciones de materiales propuestos se llevó a cabo en una termobalanza Mettler Toledo TGA/DSC 1 (Figura 11).





Figura 11. Termobalanza TGA/DSC 1 Mettler Toledo.

La finalidad de este tipo de caracterización en el marco de los objetivos del presente trabajo fue determinar si la introducción de los aditivos celulósicos añadidos a la policaprolactona modifica sus propiedades térmicas, así como establecer las temperaturas máximas de trabajo a las que será posible procesar el material bajo tratamientos térmicos, como es la impresión tridimensional mediante modelado por deposición fundida.

Durante el desarrollo del ciclo térmico en la termobalanza fue posible registrar simultáneamente datos calorimétricos del proceso. En este tipo de análisis se determinaron las transiciones térmicas del material a través de la medición de la energía en forma de calor absorbida por la muestra para incrementar su temperatura a la vez que lo hacía el crisol de referencia.

En este estudio se ha utilizado un ciclo dinámico que parte de 27°C hasta 600°C a una velocidad de 20°C/min con un flujo de aire de 10 ml/min empleando crisoles de aluminio.

La curva calorimétrica obtenida permitió situar el pico correspondiente a la fusión del material (temperatura de fusión) y su entalpía de fusión (calculada como el área de dicho pico dividida por la masa de la muestra).

Con los datos de entalpía se pudo cuantificar la cristalinidad de la muestra a través de la siguiente expresión:

$$X_c = \left(\frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0 \cdot (1 - x_{ad})}\right) \cdot 100$$

Donde  $X_c$  es la fracción cristalina de la matriz,  $\Delta H_m$  es el valor de entalpía de fusión determinado experimentalmente en este trabajo,  $\Delta H_m^0$  es el valor de la entalpía de fusión de una muestra de policaprolactona 100% cristalina (142,0 J/g) <sup>13</sup> y x<sub>ad</sub> es el valor de la fracción de aditivo introducido en la formulación.

La cristalinidad de los materiales poliméricos es un factor muy relevante, dado que influye notablemente en las propiedades mecánicas del mismo. Además, la



introducción de rellenos en matrices termoplásticas es un factor que afecta directamente a su proceso de cristalización, ya que las partículas pueden actuar como puntos de nucleación<sup>14</sup> capaces de favorecer el proceso de cristalización o bien ocluir los dominios intercristalinos dificultándolo. 15,16 Por tanto, cabe esperar que los aditivos que se proponen en este trabajo tengan algún efecto sobre el grado de cristalinidad de la policaprolactona, razón por la que se hace necesario incluir este tipo de análisis en la caracterización de los materiales composites evaluados.

Además, como complemento al estudio de la hidrofilicidad, que se describirá en mayor detalle en el siguiente apartado, se realizó un estudio mediante termogravimetría de la cantidad de agua desorbida durante el ciclo. La cantidad de agua desorbida se ha evaluado como la diferencia de peso entre el inicio del ciclo (temperatura ambiente, 25°C) y el final del ensayo (150°C).

# 3.4.2. RETENCIÓN DE FOSFATO TAMPÓN SALINO (PBS) Y AGUA

La hidrofilicidad de los materiales que se utilizan como soporte para el crecimiento de tejidos es un parámetro determinante que influye en la capacidad de proliferación de las células 17 y se relaciona, además, con la velocidad de degradación de la estructura, ya que la humectación es el primer paso para que se lleve a cabo la degradación hidrolítica del material. 18

Para evaluar si la introducción de los diferentes aditivos y recubrimientos analizados en el presente estudio supone un aumento de la hidrofilicidad de la matriz de policaprolactona se han realizado dos tipos de pruebas: la medida gravimétrica de la absorción de PBS (tampón fosfato salino) y agua y la medida del ángulo de contacto de las superficies.

Para las medidas gravimétricas se utilizó PBS, además de agua, ya que su osmolaridad y concentración en iones cloruro, sodio y potasio es muy similar a la del líquido extracelular de los mamíferos. Para la preparación del tampón fosfato salino se siguió el protocolo Cold Spring Harbor Protocols<sup>19</sup> (Tabla 2):

Componente	Cantidad a añadir (1 litro de disolución)	Concentración final
NaCl	8 g	137 mM
KCl	0,2 g	2,7 mM
Na₂HPO₄	1,44 g	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g	1,8 mM

Tabla 2. Composición del PBS utilizado para la realización del estudio de hidrofilicidad por inmersión.

Para preparar un litro de disolución se añaden las cantidades señaladas en la tabla en 800 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7,4 con HCl y se enrasa a 1 litro con agua. La esterilización puede llevarse a cabo mediante autoclavado o filtración. En este caso, se utilizó la filtración. Posteriormente, la esterilización de las piezas y el medio en conjunto se llevó a cabo mediante la irradiación con luz UV en campana durante 30 min.



Para cada uno de los intervalos de tiempo analizados, se utilizaron cuatro réplicas. Estas muestras se pesan antes del ensayo y después del ensayo tras haber sido secadas con papel de filtro y tras haber sido lavadas con agua destilada y secadas a vacío. De esta forma, la retención de PBS puede definirse mediante la siguiente expresión:

Retención de PBS = 
$$\frac{m_h - m_s}{m_s}$$

#### Donde:

 $m_h$  es la masa de la pieza tras el ensayo habiendo retirado el exceso de líquido con papel de filtro

 $m_s$  es la masa de la pieza seca tras el ensayo

Este tipo de medida es ampliamente utilizada en estudios sobre las características hidrofílicas de biomateriales susceptibles de ser utilizados en el campo de la ingeniería de tejidos. <sup>18,20</sup> Su principal ventaja frente a la medición del ángulo de contacto es que permite obtener datos para piezas tridimensionales porosas difícilmente evaluables mediante esa técnica.

Estos ensayos se realizaron en los materiales composites tanto para láminas fabricadas mediante moldeo por compresión como para estructuras tridimensionales obtenidas mediante fabricación aditiva.

#### 3.4.3. MEDICIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO

Como ensayo complementario a la determinación gravimétrica de la capacidad de los materiales para la retención de agua y PBS, se procedió a la determinación del ángulo de contacto de muestras de los materiales propuestos. Este procedimiento es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en el estudio de la mojabilidad de superficies.

Dada una gota de líquido que moja una determinada superficie en el seno de un gas (Figura 12), el ángulo de contacto se define como el ángulo que se forma entre la tangente a la interfase líquido-gas y el sólido en el lado de la gota. El ángulo de contacto es una medida cuantitativa de la afinidad de la superficie por el líquido que se analice.

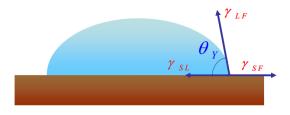


Figura 12. Relación del ángulo de contacto con las tensiones interfaciales involucradas en la descripción del proceso de formación de la gota.



En este caso, el líquido de interés es el agua, dado que los fluidos corporales tienen una base acuosa y, por tanto, el ángulo de contacto obtenido entre la superficie de los materiales propuestos y el agua da una orientación bastante próxima de la afinidad de estos materiales con los fluidos corporales. Se determinó el ángulo de contacto de la superficie de las muestras a temperatura ambiente en un goniómetro OCA-20 de DataPhysics Instruments equipado con software SCA20. Se midió el ángulo de contacto estático de gotas de agua de 8 µl realizándose 50 réplicas por muestra.

Este procedimiento fue llevado a cabo tanto sobre las muestras secas como prehumedecidas durante 24 horas a fin de confirmar si la hidratación previa del material tiene influencia sobre su mojabilidad superficial, tal como sucede con otro materiales como son el poli(glicerol sebacato)<sup>21</sup> o el poli(hidroxietil acrilato)<sup>22</sup>. En las muestras prehumedecidas, la medición se llevó a cabo tras retirar el exceso de agua con papel de filtro.

#### 3.4.4. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA DISTRIBUCIÓN DE PARTÍCULAS

Para evaluar la integración de las partículas en la matriz polimérica se obtuvieron láminas mediante moldeo por compresión que se observaron mediante microscopía óptica en un equipo Olympus BX51 (Figura 13). Este estudio se realizó de manera cualitativa debido a que los agregados de partículas se enfocaron a diferentes profundidades de la lámina, ya que la matriz utilizada es traslúcida. Esta característica provocó que la sombra de los agregados no fuera nítida no permitiendo definir de manera precisa los límites para llevar a cabo una medición precisa de los mismos (Figura 14).

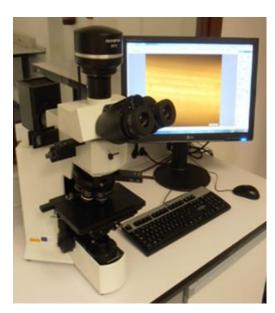


Figura 13. Microscopio Olympus BX51.



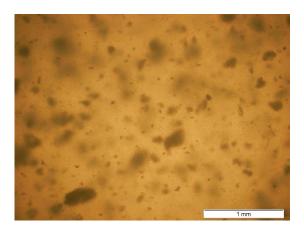


Figura 14. Lámina PCL:MCC 90:10 al microscopio.

#### 3.4.5. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

La espectroscopía infrarroja es una técnica analítica basada en el estudio de la absorción de energía por parte de una muestra de material en el rango del espectro electromagnético que da nombre a la técnica (el infrarrojo) situado entre las longitudes de onda de 780 nm a 1 mm. Dentro de esta región, es posible distinguir tres intervalos de acuerdo con su proximidad a la región visible del espectro electromagnético: el infrarrojo cercano (0,78-2,5  $\mu$ m), medio (2,5-50  $\mu$ m) y lejano (50-1000  $\mu$ m). La mayor parte de las aplicaciones analíticas se realizan en la franja del infrarrojo medio.

En un espectrofotómetro infrarrojo, se suministra energía a la muestra que se pretende analizar mediante un haz que proporciona radiación infrarroja. Esta radiación se hace pasar a través de la muestra y un detector cuantifica qué cantidad de energía es capaz de atravesarla. En esta región del espectro, las moléculas cambian su estado de energía vibracional y rotacional, absorbiendo parte de la energía suministrada. Esta absorción puede ser utilizada para la identificación de compuestos, dado que los valores de frecuencia a los que se producen los picos de absorción son característicos para cada tipo de enlace.

La reflectancia total atenuada (ATR, de sus siglas en inglés, Attenuated Total Reflectance) es una técnica que se basa en la medición de la energía absorbida por una muestra en contacto con un cristal ópticamente denso cuya reflectancia interna es capaz de proporcionar una onda evanescente que sobresale de la superficie del cristal hasta la muestra. En el recorrido de esta onda, la muestra absorbe parte de la radiación infrarroja que le llega, de tal manera que la señal que llega al detector se verá disminuida en las regiones del espectro en los que la muestra es capaz de retener parte de la energía incidente (Figura 15). Este proceso permite obtener un espectro característico de la muestra que permite el análisis de su composición química de forma similar a como se lleva a cabo cuando se utiliza la técnica de transmisión.



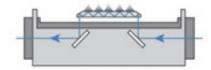


Figura 15. Esquema de funcionamiento del accesorio ATR en espectroscopía infrarrojo, 23

La espectroscopía infrarroja ha sido utilizada a lo largo de este estudio para el análisis de la interacción química entre los componentes de cada una de las formulaciones propuestas, así como el análisis del efecto de los aditivos en la cristalinidad a través del estudio de los picos de la policaprolactona relacionados con sus fases amorfa y cristalina, tal como se detallará en mayor profundidad en la presentación de los resultados y su discusión (Capítulos 4 y 5).

Para obtener los espectros se utilizó un equipo del modelo Perkin Elmer IR Spectrum Two (Figura 16) con el accesorio ATR realizando barridos entre 450 cm<sup>-1</sup> y 4000 cm<sup>-1</sup> con una resolución de 8 cm<sup>-1</sup>. Para cada espectro se tomaron 12 barridos siendo el gráfico final el promedio de las 12 mediciones realizadas. Este proceso se repitió para 5 muestras de material.



Figura 16. Equipo Perkin Elmer IR Spectrum Two.

## 3.4.6. DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

Cuando una muestra cristalina se bombardea con rayos X, parte de la radiación incidente es dispersada de tal forma que las ondas emergentes están en fase y, por tanto, se refuerzan mutuamente para formar rayos refractados (Figura 17).

La condición para que se dé la difracción, es decir, para que exista interferencia positiva entre los rayos dispersados, viene definida matemáticamente a través de la ley de Bragg:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot sen\theta$$



#### Donde:

 $\theta$  es el ángulo de incidencia

 $\lambda$  es la longitud de onda utilizada

d es la distancia interplanar de los cristales

n es un número entero igual o mayor que 1

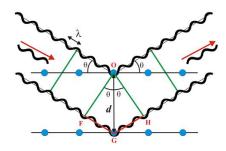


Figura 17. Esquema del proceso de dispersión de rayos X según la ley de Bragg.<sup>24</sup>

Cuando se analiza una determinada muestra mediante difracción de rayos X, un detector cuantifica la energía que se refleja a diferentes ángulos de radiación incidente. De esta forma, a determinados ángulos pueden observarse picos energéticos debidos a la interferencia positiva de las ondas emergentes. El ángulo en el que se producen estos picos, así como su intensidad, son característicos de los tipos de cristales que conforman la estructura de la muestra. De esta forma, la difracción de rayos X es una técnica útil para el análisis de la cristalinidad de muestras sólidas.

En los composites propuestos en la presente tesis doctoral, es posible que la introducción de los aditivos provoque cambios en la cristalinidad de la matriz, por lo que se hace interesante la utilización de la difracción de rayos X para valorar estos cambios. Estos resultados se analizarán de manera conjunta a los obtenidos mediante espectroscopía infrarroja y calorimetría, de tal forma que pueda comprobarse de manera concluyente el efecto del aditivo sobre la cristalinidad de la matriz.

En este estudio, las láminas de material composite PCL:MCC, así como de policaprolactona pura obtenidas mediante moldeo por compresión fueron sometidas al estudio de su patrón de difracción de Rayos X. Para ello, se utilizó un equipo Bruker D8 Advance A25, con electrodo de cobre ( $\lambda$ =0,154 nm). Las muestras se escanearon de 3 a 90° operando a un voltaje de 40 kV y una corriente de 20 mA<sup>25</sup>. Los datos así obtenidos fueron analizados con el software Materials Data Jade 5.

## 3.4.7. ENSAYOS DE TRACCIÓN

Los ensayos mecánicos realizados sobre láminas obtenidas por moldeo por compresión tienen como objetivo determinar el efecto de los aditivos sobre la matriz cuando las probetas ensayadas son macizas. La comparación de estos resultados con los realizados sobre probetas porosas obtenidas por fabricación aditiva ha permitido valorar si las diferencias de procesabilidad de los composites mediante estas técnicas tiene un efecto significativo sobre las propiedades mecánicas de las estructuras.

Las probetas empleadas fueron láminas de 60x20 mm<sup>2</sup>. Los ensayos se realizaron con una máquina Zwick Roell con control de desplazamiento a una velocidad de 10 mm/min. El módulo elástico fue evaluado como la pendiente del segmento inicial de la curva tensión-deformación obtenida.

## 3.4.8. CULTIVO CELULAR Y EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Con el fin de evaluar el efecto de los aditivos empleados en la formulación de los materiales composites sobre la funcionalidad biológica del material se han realizado diferentes cultivos celulares y ensayos de viabilidad celular sobre muestras de los materiales propuestos en el presente estudio.

En la Tabla 3 se recogen los diferentes tipos de células y ensayos biológicos realizados sobre cada tipo de muestra. La metodología específica seguida en cada caso se describe en los capítulos correspondientes a la exposición de los resultados obtenidos en el estudio de cada conjunto de materiales (Capítulos 4 y 5).

La utilización de diferentes tipos de células y ensayos de viabilidad se justifica debido a que la caracterización biológica se ha desarrollado en colaboración con diferentes grupos de investigación (Centro de Biomateriales e ingeniería tisular de la Universidad Politécnica de Valencia, Institute of Orthopaedic & Musculoskeletal Science de la University College London).

Conjunto de muestras	Tipo de cultivo	Tipo de seguimiento realizado al cultivo
Láminas PCL:CMC	Fibroblastos L929 de ratón	Cuantificación de ADN mediante ensayo PicoGreen
Láminas PCL:MCC	Células mesenquimales de cultivo primario de oveja	Evaluación de la viabilidad celular con Presto Blue ®

Tabla 3. Tipos de células y ensayos de seguimiento utilizados en la evaluación biológica de los materiales composites propuestos.

En el caso de las láminas PCL:CMC, la evolución del cultivo se valoró mediante la cuantificación de ADN mediante el método Quant-iT Pico Green®. El reactivo Pico Green® es una sustancia capaz de marcar las moléculas de ADN en disolución proporcionando un complejo fluorescente detectable con un espectrofluorómetro utilizando una longitud de onda de excitación de 480 nm y 520 nm de emisión. 26 La cantidad de ADN presente en cada célula de una determinada línea es constante y, por tanto, la cantidad de ADN que es posible extraer en cada muestra del cultivo (previa



lisis de las células presentes en el cultivo) será proporcional al número de células presentes.

Por su parte, la evolución del cultivo de células mesenquimales sobre las muestras de material composite PCL:MCC se desarrolló mediante el análisis de la viabilidad celular de las mismas basado en la reducción de la resazurina, en concreto a través del método Presto Blue ®. Este tipo de ensayos de viabilidad celular se basan en la utilización de la actividad mitocondrial para reducir el compuesto resazurina (no fluorescente) en resorufina (fluorescente) como forma de cuantificar la cantidad de células viables existentes en el medio mediante la medición de este cambio en la fluorescencia de las muestras<sup>27</sup> (Figura 18). La principal ventaja de este tipo de métodos es que se trata de un ensayo no destructivo, lo que permite emplear la misma población celular a lo largo de todo el estudio.<sup>28</sup>

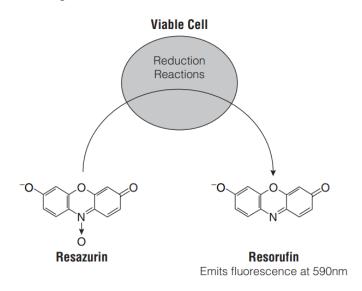


Figura 18. Esquema del fundamento de los ensayos de reducción de la resazurina.<sup>29</sup>

# 3.5. FABRICACIÓN DE ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE MATERIALES COMPOSITES

Para poder llevar a cabo la fabricación aditiva de las piezas mediante extrusión térmica alimentada por hilo fue necesario en primer lugar fabricar el filamento de alimentación con un diámetro lo más próximo posible a las especificaciones técnicas del modelo comercial de impresora utilizado (1,75 mm).

Este hilo fue obtenido mediante la extrusión en el dispositivo experimental desarrollado por el grupo de investigación que se muestra en la Figura 19. El dispositivo consta de un depósito de alimentación de material, un husillo de 8 mm de diámetro accionado por un motor paso a paso, un cilindro de acero con una relación L/D de 10 y una boquilla de extrusión de 1,6 mm. El cilindro es calefactado externamente mediante una resistencia eléctrica. La extrusión tuvo lugar a una temperatura de 120°C y una velocidad de giro de 7 rpm. Las muestras PCL:MCC 90:10 fueron extruidas a una temperatura ligeramente superior al resto (130°C), ya que ese incremento mejora sustancialmente la calidad del hilo obtenido en términos de diámetro necesario para su posterior utilización como alimentación en la máquina de fabricación aditiva



empleada para la fabricación de las estructuras porosas. Tras la extrusión, el filamento se enfrió con agua para conseguir la estabilidad dimensional del mismo.



Figura 19. Extrusora de filamento fabricada por el grupo de investigación.

De esta forma, los pellets obtenidos en la fase de formulación son alimentados a este dispositivo de extrusión para obtener hilo cuyo diámetro se midió posteriormente mediante la utilización de un micrómetro (Starrett, ±0,001 mm). Los resultados de estas mediciones se muestran en la Tabla 4.

Material	Diámetro de filamento (mm)
PCL	1,73±0,10
PCL:CMC 98:2	1,82±0,07
PCL:CMC 95:5	1,76±0,08
PCL:MCC 98:2	1,70±0,07
PCL:MCC 95:5	1,68±0,09
PCL:MCC 90:10	1,80±0,05

Tabla 4. Diámetro de filamento para cada uno de los materiales evaluados.

Los filamentos así obtenidos fueron empleados como alimentación de una impresora comercial (modelo Prusa i3) (Figura 20). Este tipo de impresora se basa en la técnica de extrusión térmica alimentada con hilo. Por su parte, la obtención de los códigos de impresión se realizó empleando el software Slic3r a partir del fichero .stl obtenido a partir del diseño CAD generado en SolidWorks.

El establecimiento de las condiciones de deposición se realizó por prueba y error en base, en primera instancia, a la observación macroscópica de la calidad morfológica de las piezas obtenidas.





Figura 20. Impresora comercial Prusa i3 con la que se obtuvieron las estructuras.

En el caso de las mezclas con carboximetilcelulosa, para temperaturas inferiores a 210°C se produce la obturación del filamento en la zona fría del cilindro que lo dirige hacia la boquilla de extrusión. Sin embargo, a esta temperatura, para velocidades de deposición inferiores a 20 mm/s, el tiempo de residencia en la boquilla a esta temperatura es excesivo y provoca la aparición de una coloración amarillenta indicativo de cierto grado de degradación del material (Figura 21).

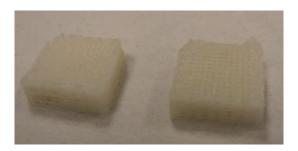


Figura 21. Piezas PCL:CMC 95:5 obtenidas a 210°C y 20 mm/s.

Para 25 mm/s, la calidad de las piezas obtenidas puede considerarse como suficiente, razón por la que las condiciones que se han seleccionado como adecuadas para la fabricación de piezas con un 5% de carboximetilcelulosa fueron 210°C y 25 mm/s (Figura 22).







Figura 22. Piezas PCL:CMC 95:5 obtenidas a 210°C y 25 mm/s.

Con estas condiciones es posible obtener piezas de mezclas de policaprolactona:carboximetilcelulosa, si bien siguen existiendo problemas de obturación de la boquilla. Esta tendencia a la obstrucción puede tener diferentes explicaciones:

- Las partículas de aditivo que se encuentran en la superficie del filamento se desprenden durante el proceso de tracción del material realizado por las ruedas de empuje que dirigen el filamento hacia la boquilla.
- Debido a la baja temperatura de fusión del material y su escasa rigidez, se forman aglomeraciones de material en la zona fría de la boquilla.

Esta última alternativa se ve respaldada por la observación puntual de estas aglomeraciones al desmontar el ventilador que refrigera la zona fría de la extrusora (Figura 23). Sin embargo, tal como se ha señalado, la formación de estas aglomeraciones es puntual y no tiene lugar en cada una de las ocasiones en las que la impresión se detiene o es defectuosa como consecuencia de la obstrucción de la boquilla. Por tanto, es posible que sean varios factores los que dificulten el proceso de deposición de este material composite.



Figura 23. Detalle de la formación de una aglomeración de material (PCL:CMC 95:5) a la entrada de la boquilla (zona fría).



Por su parte, las mezclas con celulosa microcristalina fueron obtenidas bajo las mismas condiciones a fin de obtener piezas comparables para la fase de caracterización. En este punto, es importante destacar que los filamentos aditivados con celulosa microcristalina tienen una tendencia mucho menor a la obturación de la boquilla. Por tanto, es posible concluir que la procesabilidad de este segundo tipo de combinaciones es considerablemente mejor a la procesabilidad de las mezclas de policaprolactona y carboximetilcelulosa.

# 3.6. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE MATERIALES COMPOSITES

La caracterización de las estructuras tridimensionales se ha centrado en la evaluación de aquellas propiedades que afectarán de forma decisiva sobre su potencial aplicación como soporte para la regeneración de hueso: la morfología de su estructura interna, las propiedades mecánicas y la afinidad biológica.

## 3.6.1. MORFOLOGÍA

La morfología de las piezas tridimensionales obtenidas mediante fabricación aditiva ha sido evaluada mediante diferentes técnicas: su observación por microscopía, su análisis por microtomografía computerizada y el estudio de la porosidad mediante técnicas gravimétricas.

## 3.6.1.1. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

La observación al microscopio permite confirmar si la mesoestructura de las piezas impresas es adecuada y si la introducción de los aditivos empleados dificulta la deposición de material durante el proceso de fabricación.

Para llevar a cabo esta caracterización, se han empleado un microscopio óptico modelo Olympus BX51 y un microscopio electrónico Hitachi TM3030.

Las fotografías obtenidas por microscopía electrónica han sido de utilidad para analizar la superficie de las muestras y han permitido observar qué efecto tiene la introducción de los diferentes aditivos propuestos sobre la topografía de los filamentos. El voltaje empleado durante la observación fue de 15 kV. Como paso previo a su observación, las muestras fueron metalizadas con Pd/Au durante 2 minutos a 18 mA en un metalizador SC7620.

Por su parte, las fotografías del microscopio óptico han sido utilizadas para determinar el tamaño de poro obtenido en los diferentes grupos de piezas. La morfología de los poros juega un papel fundamental no solo en términos de propiedades mecánicas de la estructura, <sup>30</sup> sino también a nivel biológico, de tal forma que el proceso de osteointegración se favorece para unos tamaños de poro situados entre 150-500 µm. <sup>31,32</sup> Como ejemplo de la importancia del tamaño de poro sobre los procesos de regeneración de tejidos musculoesqueléticos, es posible citar el trabajo de Zhang y colaboradores, <sup>33</sup> quienes analizaron cómo el tamaño promedio de los poros influye sobre la capacidad de regeneración de menisco utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.



Para la medición del tamaño de poro en este trabajo se ha empleado el software asociado al microscopio óptico utilizado (Olympus BX51). Se realizaron medidas sobre cinco piezas: tanto en la capa como sobre la capa inmediatamente inferior a la primera, ya que son las únicas que es posible observar y medir de manera directa mediante microscopía óptica (Figura 24). De esta forma, se tomaron 37 medidas de este parámetro a fin de obtener valores promedio del tamaño de poro de cada tipo de estructura.

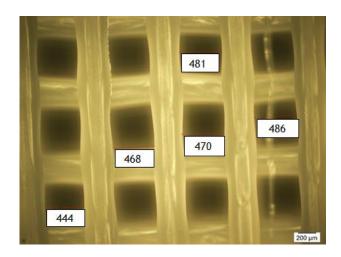


Figura 24. Fotografía al microscopio con medidas de la cara superior de una pieza de policaprolactona (Barra de escala: 200 µm).

## 3.6.1.2. OBSERVACIÓN EN MICROCT

La microtomografía computerizada consiste en la formación de imágenes tridimensionales a partir de rayos X. Con esta técnica es posible obtener imágenes de la estructura interna de las piezas impresas obtenidas a lo largo de esta tesis doctoral de forma muy precisa y no destructiva.

Si bien con las fotografías al microscopio es posible tener una idea de la mesoestructura de las piezas, así como de sus características morfológicas en la superficie de los filamentos, las imágenes obtenidas mediante microCT permiten observar su estructura interna. De esta forma, es posible obtener información acerca de la adhesión entre capas, así como de la distribución de las partículas de aditivo. Estos datos ayudan a justificar las tendencias observadas en la caracterización mecánica de los diferentes grupos de muestras.

La realización de este ensayo se llevó a cabo en un equipo Bruker SkyScan 1172 (Figura 25). Las muestras se analizaron a un voltaje de 30 kV, utilizando una intensidad de corriente de 167 µA y un paso de rotación de 0,60°.





Figura 25. Equipo de microCT Bruker SkyScan 1172.

#### 3.6.1.2. POROSIDAD

La interconectividad de los poros en una estructura susceptible de ser utilizada como medio soporte para el crecimiento de tejidos es clave para facilitar la difusión de nutrientes y oxígeno, así como la eliminación de residuos metabólicos. <sup>34</sup> Como ya se mencionó anteriormente, el tamaño de poro es uno de los parámetros que más afectan a las propiedades mecánicas de la estructura, así como a su afinidad celular.

De esta forma, además del tamaño de poro es interesante determinar los valores de porosidad global que posee la estructura. Para ello se ha utilizado un método basado en la determinación de la densidad aparente de piezas impresas y su comparativa con la densidad del material macizo. Este procedimiento se utiliza extensamente en el estudio de la porosidad de piezas obtenidas mediante fabricación aditiva <sup>35,36</sup> y se basa en la siguiente expresión:

$$Porosidad = 1 - \frac{\rho^*}{\rho_m}$$

#### Donde

 $ho^*$  es la densidad aparente de la estructura porosa, calculada como la relación de la masa de la muestra impresa entre su volumen

 $ho_m$  es la densidad del material.

La densidad del material se ha determinado utilizando muestras cilíndricas de material extruido (n=8) a las que se midió su diámetro y altura con un pie de rey  $(\pm 0,01$  mm) y su masa con una balanza analítica  $(\pm 0,0001$  g). Por su parte, la densidad aparente de las estructuras tridimensionales se determinó de manera análoga utilizando piezas de 13x13x8 mm³ (medidas nominales según el diseño CAD).



## 3.6.2. ENSAYOS MECÁNICOS

Las estructuras soporte utilizadas en ingeniería de tejidos deben tener una estabilidad mecánica suficiente para soportar los esfuerzos a los que se vea sometido el injerto tras su implantación in vivo, así como proporcionar un ambiente que se encuentre en el rango de propiedades mecánicas del tejido circundante. Por ello, la caracterización mecánica se encuentra entre las fases iniciales de evaluación de cualquier material susceptible de ser utilizado en este campo de aplicación.

En el caso concreto de los tejidos del aparato locomotor, las cargas aplicadas influyen en procesos como la mineralización del tejido óseo, la formación de matriz extracelular de tejido óseo<sup>37</sup> o incluso los procesos de diferenciación celular.<sup>38</sup>

En este estudio, se ha analizado la influencia de la introducción de los aditivos propuestos sobre el módulo de elasticidad a compresión y flexión de las estructuras composite fabricadas (PCL:MCC y PCL:CMC).

## 3.6.2.1. ENSAYO DE COMPRESIÓN

Para la evaluación de las propiedades de las estructuras porosas tridimensionales a compresión se utilizaron cuatro réplicas de 4x4x8 mm. Los ensayos se llevaron a cabo en una máquina de ensayos Zwick Roell Z0.5 (Figura 26) con una velocidad de desplazamiento del cabezal de 1 mm/min.<sup>35</sup>

El módulo de compresión se determinó utilizando la primera parte del segmento lineal de la curva tensión-deformación y el área transversal inicial. La tensión  $(\sigma)$  se calculó como la relación entre la fuerza medida durante el ensayo (F) y el área transversal aparente de la estructura (A):

 $\sigma = F/A$ 

Por su parte, la deformación (ε) se define como la relación entre la diferencia de altura en cada punto del ensayo ( $\Delta h$ ) y la altura inicial de la probeta ( $h_0$ ):

 $\varepsilon = \Delta h/h_0$ 

En cuanto a la tensión en el límite de elasticidad, este parámetro se evaluó como el primer punto en la curva tensión-deformación en el que un incremento de la deformación ocurre sin un incremento en la tensión, de acuerdo con la definición establecida en la norma ASTM D1621-16.

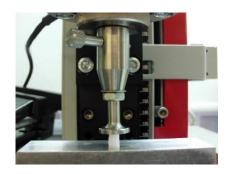


Figura 26. Ensayos de compresión llevado a cabo en máquina Zwick Roell Z0.5.



## 3.6.2.2. ENSAYO DE FLEXIÓN EN TRES PUNTOS

Para el análisis de las propiedades a flexión de las estructuras tridimensionales, se ha seguido la norma ASTM D790-15 utilizando la máquina de ensayos universal Zwick Roell (Figura 27). Los ensayos se realizaron con probetas de 2,6 mm de espesor, con una distancia entre apoyos de 14,5 mm y con una velocidad de bajada del cabezal de 1 mm/min.



Figura 27. Ensayos de flexión llevado a cabo en máquina universal Zwick Roell.

De acuerdo con la norma, la tensión a flexión viene dada por la siguiente expresión:

$$\sigma_f = (3 \cdot P \cdot L)/(2 \cdot b \cdot d^2)$$

Donde:

 $\sigma_f$  es la tensión que sufre la muestra en el punto medio

P es la carga en un punto dado de la curva carga-desplazamiento

L es la distancia entre puntos de apoyo

b es el ancho de la probeta

d es el espesor de la probeta

Por su parte, la deformación se determina a través de la siguiente expresión:

$$\varepsilon_f = (6 \cdot D \cdot d)/L^2$$



Donde:

 $\varepsilon_f$  es la deformación en la superficie exterior

D es la deflexión máxima en el centro de la probeta

Por último, la determinación del módulo de elasticidad se efectúa a través de la siguiente expresión:

$$E = \frac{L^3 \cdot m}{4 \cdot b \cdot d^3}$$

Donde:

E es el módulo de elasticidad

m es la pendiente de la curva carga-deformación (N/mm) en su porción lineal inicial

## 3.6.3. CULTIVO CELULAR Y EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Tal como se mencionó en el apartado 3.4.8. de este capítulo, los ensayos celulares han sido diferentes para los grupos de muestras evaluados debido a que fueron realizados durante las estancias llevadas a cabo durante el desarrollo de la presente tesis doctoral.

En la Tabla 5 se especifican el tipo de células y de estudio de la viabilidad celular seguido en cada caso para la evaluación biológica de los diferentes tipos de estructuras tridimensionales de materiales composites obtenidas mediante fabricación aditiva. En los capítulos 4 y 5 puede encontrarse una explicación más detallada del método experimental llevado a cabo en cada caso.

En este caso, el seguimiento de los cultivos se ha realizado para ambos tipos de muestras mediante la determinación de la viabilidad celular mediante la reducción de la resazurina: con el método Alamar Blue ® en el caso de los grupos PCL:CMC y con el protocolo Presto Blue ® para las muestras PCL:MCC.

Conjunto de muestras	Tipo de cultivo	Tipo de seguimiento realizado al cultivo
Estructuras tridimensionales PCL:CMC	Células mesenquimales de cultivo primario de oveja	Evaluación de la viabilidad celular con Alamar Blue ®
Estructuras tridimensionales PCL:MCC	Células mesenquimales de cultivo primario de oveja	Evaluación de la viabilidad celular con Presto Blue ®

Tabla 5. Tipos de células y ensayos de seguimiento utilizados en la evaluación biológica de los materiales composites propuestos.



## 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El test de contraste de hipótesis empleado para la comparativa de varios grupos simultáneamente fue el test no paramétrico Kruskal Wallis ejecutado a través del software Matlab. En aquellos casos donde se determinó que existe al menos un grupo que tiene diferencia significativa con respecto al resto, se realizó un análisis multicomparativo a través del método de HSD Tukey's. Por su parte, en aquellas ocasiones donde se compararon grupos dos a dos el test empleado fue el de Wilcoxon.

En este trabajo, se ha tomado como diferencia significativa un valor de p<0.05 y como altamente significativo, un valor de p<0.01.

## 3.8. TRATAMIENTO SUPERFICIAL DE MUESTRAS DE POLICAPROLACTONA

Hasta el momento se han descrito los métodos de procesado y caracterización de materiales composites obtenidos mediante la aditivación de una matriz de policaprolactona.

Como alternativa a esta propuesta para mejorar las propiedades de la policaprolactona, se han valorado métodos de modificación superficial basados en el anclaje de sustancias contenidas en el extracto del aloe vera previa funcionalización con plasma de la superficie. La funcionalización con plasma se llevó a cabo en un equipo de laboratorio Zepto Diener (Figura 28) empleándose una presión de oxígeno de 1,2-1,3 mbar y una potencia de 30 W durante 5 minutos. Estas condiciones de potencia y tiempo de exposición fueron seleccionadas en base a la Revisión del Estado del arte presentada en el Capítulo 2.<sup>39,40</sup>

Este procedimiento se ha llevado a cabo tanto con muestras de láminas de policaprolactona obtenidas mediante moldeo por compresión, como con estructuras tridimensionales impresas. El ciclo de moldeo por compresión utilizado ha sido el ya descrito en el primer apartado del presente capítulo (3.1. *Preparación de materiales* composites), mientras que el procedimiento empleado para la fabricación de las estructuras tridimensionales empleadas en esta fase se describe en la subsección 3.8.2.



Figura 28. Equipo de plasma Zepto Diener utilizado para la funcionalización de muestras.



## 3.8.1. PROCEDIMIENTO DE RECUBRIMIENTO CON EXTRACTO DE ALOE VERA

El extracto de aloe empleado ha sido cedido por la empresa Costa Canaria Aloe Vera. Este producto comercial tiene un 99% de extracto de aloe y el porcentaje restante está compuesto de ácido ascórbico, ácido cítrico, vitamina E, sorbato potásico y bezoato de sodio; que actúan como conservantes del producto. De acuerdo con los ensayos de control de calidad del producto, este extracto tiene un 99,3% de humedad y un valor por debajo del 0,0007% (p/p) de aloína (determinación realizada mediante HPLC). Este extracto fue centrifugado a 3000 rpm durante 20 minutos con el objetivo de eliminar la fracción sólida (principalmente fibras celulósicas) contenidas en el producto comercial.

Tal como se comentó en el Capítulo 2. Revisión del estado del arte, uno de los compuestos con mayor bioactividad en el extracto del aloe vera es el acemanano (Figura 29). Chokboribal y colaboradores<sup>41</sup> demostraron que el grado de acetilación de este compuesto afecta a su actividad. Por consiguiente, sería deseable que el anclaje entre el carbohidrato y la superficie funcionalizada de la policaprolactona se llevara a cabo a través de la interacción de esta con los grupos hidroxilo del acemanano, dejando libres los extremos acetilados.

Figura 29. Estructura química del acemanano.

Dado que los grupos que se generan en la superficie de la policaprolactona durante el tratamiento con plasma con oxígeno son fundamentalmente carboxilos, 39,40 y de acuerdo con los principios de la química orgánica, la interacción que cabe esperar entre ambos tipos de grupos funcionales es la esterificación. Este tipo de reacción tiene lugar en medio ácido. La presencia de diferentes ácidos orgánicos (láctico, acético, succínico, etc)<sup>42</sup> en el extracto del aloe otorgan a esta sustancia un ligero carácter ácido (pH 4 de acuerdo las mediciones llevadas a cabo durante el desarrollo del presente estudio). De esta forma, es posible valorar como factible el anclaje de los grupos hidroxilo de los carbohidratos presentes en el extracto del aloe vera (entre ellos el acemanano) a la superficie de la policaprolactona tratada con plasma mediante una reacción de esterificación.

No obstante, debido a la importancia que puedan tener las condiciones de pH en el desarrollo de esta reacción, se ha evaluado su desarrollo a 3 valores diferentes de este parámetro: pH 3, pH 4 y pH 5. La acidificación a pH 3 se ha llevado a cabo mediante adición de HCl (0,018M), el valor de pH 4 es el correspondiente al extracto empleado sin modificar y el pH 5 se ha ajustado mediante adición de una disolución de NaOH (0,5M). En este punto cabe mencionar que se ha descartado la utilización de



valores de pH excesivamente bajos para evitar el riesgo de hidrólisis de las cadenas de carbohidratos.

El procedimiento de recubrimiento consistió en la inmersión de las muestras en un volumen de 1 ml de extracto/muestra, habiendo ajustado previamente el pH. El proceso se llevó a cabo en tubos de centrífuga utilizando agitación durante todo el desarrollo del mismo (Figura 30), que tuvo una duración total de 3 horas.



Figura 30. Sistema de agitación durante el procedimiento de recubrimiento de las piezas con extracto de aloe vera.

Transcurrido este tiempo, las muestras fueron extraídas de los tubos y lavadas con etanol a fin de precipitar los polisacáridos insolubles en alcohol adheridos y, simultáneamente, arrastrar la fracción residual que no se ha adherido a la superficie. Este procedimiento fue análogo en el caso de las muestras macizas obtenidas mediante moldeo por compresión y las estructuras porosas obtenidas mediante fabricación aditiva.

# 3.8.2. FABRICACIÓN DE ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES PARA POSTERIOR TRATAMIENTO SUPERFICIAL

Dado que en esta sección del estudio que se presenta se han fabricado exclusivamente estructuras de policaprolactona pura, no es necesario utilizar una velocidad de 25 mm/s para evitar la degradación del aditivo, tal como se proponía para las estructuras composites en el apartado 3.5. Fabricación de estructuras tridimensionales de materiales composites. Por ello, las muestras con las que se ha trabajado en este apartado se imprimieron a una velocidad de 20 mm/s, con la que se consigue una mejor calidad de la deposición en las estructuras de poliaprolactona pura. Por su parte, la temperatura empleada sí fue la misma que en el resto de apartados, es decir, 210°C.



## 3.9. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS SUPERFICIES

Para determinar el efecto del tratamiento con plasma y posterior recubrimiento con el extracto de aloe vera sobre las superficies de policaprolactona se llevó a cabo la realización de diferentes ensayos: espectroscopía infrarroja, análisis elemental de la superficie mediante EDS (espectroscopía de energía dispersiva de rayos X), determinación de la concentración de carboxilos presentes en la superficie mediante el método de la toluidina (TBO) y medición del ángulo de contacto. Estos ensayos se realizaron sobre un grupo de muestras de policaprolactona sin tratar, un grupo de muestras en el que se realizó exclusivamente el tratamiento con plasma a 30 W durante 5 minutos y tres grupos de muestras en las que se realizó, además del tratamiento con plasma, el recubrimiento con el extracto de aloe vera a los tres valores de pH anteriormente mencionados (pH 3, pH 4 y pH 5).

El empleo de estos grupos de muestras tiene como finalidad poder comparar los resultados obtenidos sobre las muestras de aloe vera, no solo con la policaprolactona sin tratar, sino también sobre la policaprolactona tratada con plasma, al ser este tratamiento el utilizado en mayor medida en el Estado del Arte como modificación superficial capaz de mejorar la afinidad celular de la policaprolactona.

## 3.9.1. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

De manera análoga a la ya descrita para la caracterización de la estructura química de los materiales composites, para la obtención de los espectros de las muestras funcionalizadas, así como para las funcionalizadas y recubiertas, se empleó el modelo Perkin Elmer IR Spectrum Two con el accesorio ATR. Los barridos se realizaron entre 450 cm<sup>-1</sup> y 4000 cm<sup>-1</sup> con una resolución de 8 cm<sup>-1</sup> y se utilizaron 12 barridos para generar el espectro de cada muestra.

## 3.9.2. MÉTODO DE LA TOLUIDINA

La concentración superficial de carboxilos sobre una muestra sólida puede cuantificarse a través del método de la toluidina. 43,44 Este colorante catiónico (Figura 31) es capaz de enlazarse a los grupos carboxílicos en proporción molar 1:144 en medio básico.

$$H_3C$$
 $H_2N$ 
 $S$ 
 $CI$ 
 $CH_3$ 

Figura 31. Estructura química del azul de toluidina-O.

Las moléculas de colorante se desorben en medio ácido. Por consiguiente, es posible cuantificar la cantidad de grupos carboxilos disponibles en la superficie de una determinada muestra siguiendo el siguiente procedimiento: se añaden 2 ml por muestra de una disolución 0,5 mM de toluidina-O azul (TBO) en sosa 0,1 mM y se dejan reaccionar durante 20 horas. Transcurrido este tiempo, se extraen las muestras del



tubo de ensayo y se lavan con sosa 0,1 mM a fin de eliminar los restos de TBO que no se han absorbido sobre la superficie de las muestras. A continuación se desorbe el colorante mediante tratamiento con 2 ml de ácido acético al 50% durante 10 minutos. Esta solución se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 633 nm. Los valores de concentración de toluidina se obtienen a través de una recta de calibrado obtenida como paso previo al ensayo.

Con estos valores de concentración, es posible determinar la concentración superficial de grupos carboxilos teniendo en cuenta el área de la muestra tratada y que, tal como se citó anteriormente, la unión entre los grupos carboxilos y la toluidina tiene lugar en una proporción molar 1:1.

## 3.9.3. MEDICIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO

El ángulo de contacto se midió con un goniómetro OCA15 Dataphysics a temperatura ambiente. Se utilizó una gota de 3 µl de volumen y una velocidad de salida de la gota de 1 µl/s empleando el software SCA20 para la obtención y tratamiento de los datos. Se utilizaron como líquidos el agua, el glicerol y el diyodometano para obtener el ángulo de contacto de las diferentes superficies.

Para la determinación de la energía superficial se empleó el método de Owens, Wendt, Rabel y Kaelble (OWRK). Este método parte de la consideración de que las interacciones responsables de la tensión superficial que se genera en un material sólido son de dos tipos: polares y dispersivas, siendo la energía libre superficial total la suma de ambas contribuciones. 46

De acuerdo con el método OWRK, es posible determinar la energía libre de una superficie a través de la medición del ángulo de contacto con dos líquidos de tensiones superficiales conocidas, ya que se cumple que:

$$\gamma_{sl} = \gamma_{sv} + \gamma_{lv} - 2\left(\sqrt{\gamma_{sv}^d \cdot \gamma_{lv}^d} + \sqrt{\gamma_{sv}^p \cdot \gamma_{lv}^p}\right)$$

En esta ecuación, la variable  $\gamma$  hace referencia a la energía superficial, los subíndices indican la interfase en la que se evalúa dicho parámetro y el superíndice si se trata de la componente polar o dispersiva.

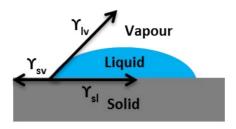


Figura 32. Esquema de las tensiones superficiales que influyen en la formación de una gota sobre una determinada superficie sólida.<sup>46</sup>



Por su parte, la ecuación de Young relaciona la energía libre de la superficie con el ángulo de contacto:

$$\gamma_{sv} - \gamma_{sl} = \gamma_{lv} \cdot cos\theta$$

Si se igualan las expresiones y se reordenan los términos es posible obtener la siguiente ecuación:

$$\frac{\gamma_{lv} \cdot (cos\theta + 1)}{2 \cdot \sqrt{\gamma_{lv}^d}} = \sqrt{\gamma_{sv}^d} + \frac{\sqrt{\gamma_{lv}^p}}{\sqrt{\gamma_{lv}^d}} \cdot \sqrt{\gamma_{sv}^p}$$

Si se trata esta ecuación como una recta de pendiente $\sqrt{\gamma_{sv}^p}\,$  y  $\sqrt{\gamma_{sv}^d}\,$  de ordenada en el origen, es posible determinar las componentes polar y dispersiva y, en consecuencia, la energía libre superficial de los diferentes materiales. Para obtener los parámetros de dicha recta serán necesarias mediciones del ángulo de contacto con al menos dos líquidos diferentes sobre las muestras que pretenden analizarse.

## 3.9.4. ANÁLISIS ELEMENTAL POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X

El análisis elemental por energía dispersiva de rayos X se basa en la cuantificación de los fotones de rayos X liberados durante la transición electrónica que se produce en una muestra al ser bombardeada con un haz de electrones en un microscopio electrónico (en este caso de barrido). La energía que se libera en estas transiciones es característica del peso atómico del elemento y, por tanto, su medición puede emplearse para la identificación y cuantificación elemental de una muestra sólida.

El análisis elemental de las muestras tratadas con plasma, así como de las recubiertas con extracto de aloe vera, tiene como finalidad disponer de datos de relación de cantidad de oxígeno y carbono en la superficie. Los tratamientos empleados modifican las cantidades relativas de estos elementos. Por consiguiente, estas mediciones supondrán una medición indirecta del grado de desarrollo de los procedimientos descritos y su efecto sobre la composición de las superficies de las muestras.

En este estudio, el análisis elemental se ha llevado a cabo con la sonda acoplada a un microscopio electrónico de barrido Hitachi TM 3030 a un voltaje de 15 kV utilizando una magnificación del área observada de 100x.



# 3.10. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SUPERFICIALES

La evaluación de la afinidad biológica de las muestras recubiertas con aloe vera, tratadas con plasma y sin tratar se realizó a través de la medición de la viabilidad celular de fibroblastos de ratón cultivadas durante diferentes períodos de tiempo sobre dichas muestras.

En este apartado se define el procedimiento empleado para realizar este cultivo, así como la cuantificación de la viabilidad celular. Además, se incluye la descripción del método empleado para la observación al microscopio de las muestras con células realizada al finalizar el experimento que se realizó a fin de comprobar cómo se distribuyen las células en las piezas impresas durante el proceso de colonización de la estructura.

#### 3.10.1. CULTIVO CELULAR

El cultivo celular se llevó a cabo con fibroblastos de ratón L929. Estas células se cultivaron en medio DMEM con alto contenido en glucosa (HyClone) suplementado con un 10% de suero fetal FBS (Gibco) y un 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (Solarbio) en incubadora a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada 24 horas hasta alcanzar una confluencia del 80%. En ese momento, las células se desanclaron de la superficie de la placa Petri donde habían sido cultivadas con una disolución tripsina-EDTA (0,5%). Se resuspendieron en medio y se calculó la concentración de células de dicha suspensión empleando un contador automático (Cellometer Auto 2000, Nexcelom Bioscience LLC) (Figura 33).



Figura 33. Contador de células utilizado durante la realización del cultivo celular.

Con respecto a las muestras utilizadas como soporte del cultivo, se utilizaron cuatro réplicas de discos de 8 mm de diámetro troquelados con un punch de biopsia a partir de láminas obtenidas mediante moldeo por compresión y posteriormente tratadas con plasma y/o plasma más recubrimiento de aloe vera. Estas muestras fueron esterilizadas mediante inmersión en etanol durante media hora y posteriormente se les realizó un lavado por triplicado con PBS y medio (DMEM high glucose, Hyclone). A continuación fueron expuestas a UV en campana de flujo laminar durante una hora y conservadas en el incubador a 37°C durante 90 minutos antes de realizar la siembra.



Esta última etapa se consideró necesaria para asegurar que la superficie de las muestras estuviese seca antes de llevar a cabo la siembra de células a fin de garantizar que las gotas de suspensión de células no se deslizan por la superficie de las muestras hacia el fondo del pocillo.

La siembra de células se realizó depositando una gota de 20 µl que contenía 30000 células sobre cada una de las muestras. Posteriormente, se incubó la placa a 37°C durante 30 minutos para permitir que las células se adhirieran al centro de la muestra antes de añadir el resto de medio necesario para llevar a cabo el cultivo (750 μl). El cultivo se llevó a cabo con placas de pocillos con el fondo sin tratar (Corning) para evitar que las células se adhieran preferiblemente sobre esta superficie frente a la superficie de la muestra.

Con respecto a las piezas impresas, se troquelaron muestras de 8 mm de diámetro a partir de láminas impresas de 15x25 mm² de área. Estas muestras fueron esterilizadas mediante inmersión en etanol durante media hora, seguida de exposición a ultravioleta en campana de flujo laminar durante 1 hora y posterior lavado por triplicado con PBS y medio (DMEM, HyClone). En este caso, la última etapa de preparación de las muestras fue el lavado con medio a fin de que las muestras estuvieran húmedas al añadir la suspensión de células y así facilitar que dicha suspensión fuera capaz de introducirse en la estructura porosa de las piezas impresas.

En este caso, la siembra se realizó utilizando tubos de centrífuga de 15 ml. En cada tubo se colocó una muestra y 2 ml de medio que contenían una cantidad de 150000 células. Durante una hora, estos tubos fueron almacenados en incubadora a 37°C y 5% de CO₂ y retirados cada diez minutos para realizar una agitación manual de los mismos para garantizar un contacto adecuado entre la suspensión de células y la superficie de las piezas impresas. Posteriormente, se incubaron los tubos durante un día para permitir que las células se anclaran adecuadamente sobre las muestras. Transcurrido este tiempo, fueron transferidas a una placa de 24 pocillos con fondo sin tratar (Corning) para llevar a cabo el resto del cultivo en este contenedor.

## 3.10.2. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se evaluó, tanto en las piezas obtenidas mediante moldeo por compresión como en las piezas impresas, a través del método CCK-8 (Cell counting kit-8, Dojindo Molecular Technologies). La sal empleada en este método (Dojindo's tetrazolium, WST-8) produce un colorante de formazán soluble en agua tras haber sufrido una reacción de reducción (Figura 34).

Figura 34. Reacción de reducción del reactivo empleado en el método CCK-8.



En un cultivo celular, las deshidrogenasas presentes en las células viables son capaces de reducir el reactivo WST-8 a WST-8 formazán, siendo este último una sustancia coloreada que es posible cuantificar mediante espectrofotometría (Figura 35).

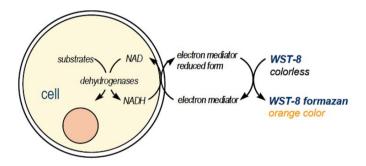


Figura 35. Fundamento para la cuantificación de células viables mediante el método CCK-8.

En este estudio, las muestras sobre las que se desarrolla el cultivo fueron lavadas con 1 ml de PBS y posteriormente se añadió 1 ml de medio que contenía un 10% (v/v) de reactivo WST-8. Posteriormente, se llevó a cabo la incubación de las placas durante 4 horas a  $37^{\circ}$ C y con un 5% CO<sub>2</sub>. Tras este período de tiempo, se tomaron dos alícuotas de  $100~\mu l$  cada una de los pocillos donde se encuentran las muestras y se transfirieron a una placa de 96 pocillos para llevar a cabo la lectura de la absorbancia de estas alícuotas con un lector Multiskan Go (Thermo Scientific) a  $450~\rm nm$ .

## 3.10.3. TINCIÓN CÉLULAS VIVAS/CÉLULAS MUERTAS

Tras 15 días de cultivo, una réplica de cada uno de los grupos de muestras tridimensionales fue empleada para llevar a cabo la tinción células vivas/células muertas y su posterior observación al microscopio.

Para ello, se retiró el medio (DMEM) de los pocillos de la placa y se lavaron las muestras tres veces con PBS para evitar la interferencia del FBS durante el proceso de tinción. Thermo los reactivos de la tinción células vivas/células muertas (Invitrogen, Thermo Scientific), que consisten en una disolución de calceína AM 4mM en dimetilsulfóxido anhidro y una disolución de homodímero-1 de etidio 2 mM en dimetilsulfóxido: agua 1:4. Se diluyeron 0,5 µl del primer reactivo y 2 µl del segundo en 1 ml de PBS. Para cada muestra, se añadieron 200 µl de esta disolución y se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras la incubación, las muestras se lavaron dos veces con PBS para eliminar los restos de reactivo. Finalmente, se observaron las muestras en un microscopio confocal Nikon Eclipse (Figura 36), apareciendo en la imagen las células vivas marcadas en verde y las muertas, en rojo.



Figura 36. Microscopio confocal Nikon Eclipse utilizado para la observación de las muestras tras la tinción vivas/muertas.

## 3.11. CONCLUSIONES

En este capítulo se han presentado los métodos utilizados para la formulación de los composites propuestos en este estudio y que se basan en la combinación de policaprolactona con celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa, así como la descripción del proceso de fabricación de piezas de estos materiales mediante impresión 3D y su caracterización desde diferentes puntos de vista: morfológico, mecánico, químico y de funcionalidad biológica.

En base a las observaciones realizadas durante el desarrollo de estos procedimientos es posible extraer las siguientes conclusiones:

- Las mezclas policaprolactona:celulosa microcristalina procesabilidad mayor que las de policaprolactona:carboximetilcelulosa para su utilización en la fabricación aditiva por extrusión alimentada con hilo con el equipo comercial empleado en el presente trabajo.
- En este estudio se emplearon las mismas condiciones de temperatura y velocidad de deposición para la impresión de todas las piezas obtenidas en material composite a fin de obtener resultados comparables entre las distintas formulaciones evaluadas. Sin embargo, es posible que la mezcla con celulosa microcristalina tenga un intervalo de procesabilidad más amplio, lo cual es un estudio interesante que se podría llevar como continuación del presente trabajo.

Por otra parte, se describen los procedimientos empleados para realizar recubrimientos de aloe vera sobre superficies de policaprolactona previamente tratadas con plasma de oxígeno.

Debido a la novedad de este tipo de recubrimientos, en este trabajo se han modificado un número limitado de variables que pueden afectar al procedimiento de anclaje del aloe vera: se han empleado tres valores de pH, pero un único valor del tiempo de exposición y un solo pretratamiento por plasma (definido por el valor de la potencia y tiempo de exposición empleados).



Sería interesante como línea futura realizar un análisis pormenorizado de las reacciones que tienen lugar en la superficie de la policaprolactona durante el recubrimiento con el extracto de aloe vera, incluyendo un estudio parametrizado de los factores anteriormente citados, que pueden afectar de manera decisiva a las características del recubrimiento final y, por tanto, a su funcionalidad.



## 3.12. REFERENCIAS

- Vajravelu K, Prasad KV, Datti PS, Raju BT. MHD flow and heat transfer of an 1. Ostwald-de Waele fluid over an unsteady stretching surface. Ain Shams Engineering Journal 2014;5(1):157-167.
- 2. Rojas O. Introducción a la reología.; 1999.
- 3. Mahishi M. Material Characterization for thin wall molding simulation. In: Engineering SoP, editor; 1998; Atlanta, Georgia.
- Wang Js, Porter RS. On the viscosity-temperature behavior of polymer melts. 4. Rheologica Acta 1995;34(5):496-503.
- Mitsoulis E. Computational Polymer Processing. In: Gujrati PD, Leonov AI, 5. editors. Modeling and simulation in polymers. Germany: Wiley; 2010. p 127-188.
- Kozicki W, Tiu C. Parametric modeling of flow geometries in non-newtonian 6. flows. In: Cheremisinoff NP, editor. Encyclopedia of fluid mechanics. Volume 7.; 1988.
- 7. Martínez Pérez A. Análisis de la fenomenología de inyección en condiciones asimétricas tipo IMD. Modelos viscosos para su simulación. . Universidad de Zaragoza
- 8. Koszkul J, Nabialek J. Viscosity models in simulation of the filling stage of the injection molding process. Journal of Materials Processing Technology 2004;157-158(SPEC. ISS.):183-187.
- 9. Bylund G. Manual de industrias lácteas; 2002.
- Ortega Z, Alemán ME, Benítez AN, Monzón MD. Theoretical-experimental 10. evaluation of different biomaterials for parts obtaining by fused deposition modeling. Measurement: Journal of the International Measurement Confederation 2016;89:137-144.
- 11. Perstorp. Capa 6800 data sheet. 2016.
- 12. Lever T. Optimizing DSC Experiments. In: Craig DQM, Reading M, editors. Thermal Analysis of pharmaceuticals: CRC Press; 2006.
- Bajsić EG, Bulatović VO, Slouf M, Šitum A. Characterization of Biodegradable 13. Polycaprolactone Containing Titanium Dioxide Micro and Nanoparticles. International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering 2014;8(7).
- 14. Natami Subramanian M. Polymer Blends and Composites. United States: Wiley; 2017.
- 15. Sigueira G, Bras J, Dufresne A. Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. Polymers 2010;2(4):728-765.
- 16. Lin HM, Lin YH, Hsu FY. Preparation and characterization of mesoporous bioactive glass/ polycaprolactone nanofibrous matrix for bone tissues engineering. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2012;23(11):2619-2630.
- 17. Dowling DP, Miller IS, Ardhaoui M, Gallagher WM. Effect of surface wettability and topography on the adhesion of osteosarcoma cells on plasma-modified polystyrene. Journal of Biomaterials Applications 2011;26(3):327-347.



- 18. Mukundan S, Sant V, Goenka S, Franks J, Rohan LC, Sant S. Nanofibrous composite scaffolds of poly(ester amides) with tunable physicochemical and degradation properties. European Polymer Journal 2015;68:21-35.
- 19. Protocols CSH. Phosphate-buffered saline (PBS). 2006.
- 20. Scaffaro R, Lopresti F, Botta L, Rigogliuso S, Ghersi G. Integration of PCL and PLA in a monolithic porous scaffold for interface tissue engineering. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 2016;63:303-313.
- 21. Conejero-García Á, Gimeno HR, Sáez YM, Vilariño-Feltrer G, Ortuño-Lizarán I, Vallés-Lluch A. Correlating synthesis parameters with physicochemical properties of poly(glycerol sebacate). European Polymer Journal 2017;87:406-419.
- 22. Vallés-Lluch A, Gallego Ferrer G, Monleón Pradas M. Effect of the silica content on the physico-chemical and relaxation properties of hybrid polymer/silica nanocomposites of P(EMA-co-HEA). European Polymer Journal 2010;46(5):910-917.
- 23. Scientific TF. Técnicas de muestreo de FTIR: Reflectancia total atenuada (ATR).
- 24. Científicas DdCyBedCSdI. Dispersión y difracción. Ley de Bragg. Volume 2018.
- 25. Jonnalagadda JB, Rivero IV, Warzywoda J. In-vitro degradation characteristics of poly(e-caprolactone)/poly(glycolic acid) scaffolds fabricated via solid-state cryomilling. Journal of Biomaterials Applications 2015;30(4):472-483.
- 26. Invitrogen. Quant-iT Pico Green dsDNA reagent and kits. MP 07581; 2008.
- 27. Sonnaert M, Papantoniou I, Luyten FP, Schrooten J. Quantitative Validation of the Presto Blue™ Metabolic Assay for Online Monitoring of Cell Proliferation in a 3D Perfusion Bioreactor System. Tissue Engineering Part C: Methods 2015;21(6):519-529.
- 28. Escobar M L, Aristizábal G FA. Fluorometric assay for cell proliferation in human tumor cell lines application. Vitae 2010;17(2):173-180.
- 29. Promega. CellTiter-Blue Cell Viability Assay. Instructions for Use of products G8080, G8081, G8082.
- 30. Perez RA, Mestres G. Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration. Materials Science and Engineering C 2016;61:922-939.
- 31. Chuenjitkuntaworn B, Inrung W, Damrongsri D, Mekaapiruk K, Supaphol P, Pavasant P. Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2010;94(1):241-251.
- 32. Gómez-Lizárraga KK, Flores-Morales C, Del Prado-Audelo ML, Álvarez-Pérez MA, Piña-Barba MC, Escobedo C. Polycaprolactone- and polycaprolactone/ceramic-based 3D-bioplotted porous scaffolds for bone regeneration: A comparative study. Materials Science and Engineering: C 2017;79(Supplement C):326-335.
- 33. Zhang Z-Z, Jiang D, Ding J-X, Wang S-J, Zhang L, Zhang J-Y, Qi Y-S, Chen X-S, Yu J-K. Role of scaffold mean pore size in meniscus regeneration. Acta Biomaterialia 2016;43:314-326.
- 34. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. Tissue Engineering Part B: Reviews 2013;19(6):485-502.



- 35. Domingos M, Intranuovo F, Gloria A, Gristina R, Ambrosio L, Bártolo PJ, Favia P. Improved osteoblast cell affinity on plasma-modified 3-D extruded PCL scaffolds. Acta Biomaterialia 2013;9(4):5997-6005.
- 36. Domingos M, Chiellini F, Gloria A, Ambrosio L, Bartolo P, Chiellini E. Effect of process parameters on the morphological and mechanical properties of 3D Bioextruded poly(1-caprolactone) scaffolds. Rapid Prototyping Journal 2012;18(1):56-67.
- 37. Banes AJ, Wall M, Garvin J, Archambault J. Cytomechanics: Signaling to mechanical load in connective tissue cells and its role in tissue engineering. In: Guilak F, Butler DL, Goldstein SA, Mooney DJ, editors. Functional Tissue Engineering. United States: Springer; 2003.
- 38. Doblaré M, Merodio J. An introduction to biomechanics and mechanobiology. In: Doblaré M, Merodio J, editors. Biomechanics. Encyclopedia of life support systems.: Eolss Publishers; 2015.
- 39. Can-Herrera LA, Ávila-Ortega A, de la Rosa-García S, Oliva AI, Cauich-Rodríguez JV, Cervantes-Uc JM. Surface modification of electrospun polycaprolactone microfibers by air plasma treatment: Effect of plasma power and treatment time. European Polymer Journal 2016;84:502-513.
- 40. Ma Z, He W, Yong T, Ramakrishna S. Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation. Tissue Engineering 2005;11(7-8):1149-1158.
- 41. Chokboribal J, Tachaboonyakiat W, Sangvanich P, Ruangpornvisuti V, Jettanacheawchankit S, Thunyakitpisal P. Deacetylation affects the physical properties and bioactivity of acemannan, an extracted polysaccharide from Aloe vera. Carbohydrate Polymers 2015;133:556-566.
- 42. Bozzi A, Perrin C, Austin S, Arce Vera F. Quality and authenticity of commercial aloe vera gel powders. Food Chemistry 2007;103(1):22-30.
- Rödiger S, Ruhland M, Schmidt C, Schröder C, Grossmann K, Böhm A, Nitschke 43. J, Berger I, Schimke I, Schierack P. Fluorescence dye adsorption assay to quantify carboxyl groups on the surface of poly(methyl methacrylate) microbeads. Analytical Chemistry 2011;83(9):3379-3385.
- Ying L, Yin C, Zhuo RX, Leong KW, Mao HQ, Kang ET, Neoh KG. Immobilization 44. of galactose ligands on acrylic acid graft-copolymerized poly(ethylene terephthalate) film and its application to hepatocyte culture. Biomacromolecules 2003;4(1):157-165.
- Kaelble DH. Dispersion-Polar Surface Tension Properties of Organic Solids. The 45. Journal of Adhesion 1970;2(2):66-81.
- Annamalai M, Gopinadhan K, Han SA, Saha S, Park HJ, Cho EB, Kumar B, Patra 46. A, Kim SW, Venkatesan T. Surface energy and wettability of van der Waals structures. Nanoscale 2016;8(10):5764-5770.
- 47. technologies Id. Live/dead viability/cytotoxicity kit for mammalian cells. MP 03224; 2005.



## 3.13. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Exterior molino ultracentrífugo ZM20057
Figura 2. Interior molino ultracentrífugo ZM20057
Figura 3. Prensa P 200 P/M Collin (izquierda) y detalle del interior de la máquina de compresión con mezcla PCL:CMC 95:5 antes del ciclo de calentamiento (derecha)58
Figura 4. Curvas de flujo para distintos tipos de fluidos60
Figura 5. Esquema de reómetros rotacionales: placas paraleleas (A), cono y plato (B), cilindros concéntricos (C)
Figura 6. Esquema de reómetro capilar64
Figura 7. Esquema de líneas de flujo en el interior de un reómetro capilar65
Figura 8. Representación gráfica del factor de corrección de Bagley67
Figura 9. Alzado del dispositivo de extrusión empleado para la caracterización de las propiedades de flujo de los materiales empleados
Figura 10. Diagrama de funcionamiento de una termobalanza70
Figura 11. Termobalanza TGA/DSC 1 Mettler Toledo
Figura 12. Relación del ángulo de contacto con las tensiones interfaciales involucradas en la descripción del proceso de formación de la gota
Figura 13. Microscopio Olympus BX5174
Figura 14. Lámina PCL:MCC 90:10 al microscopio
Figura 15. Esquema de funcionamiento del accesorio ATR en espectroscopía infrarrojo. 23
Figura 16. Equipo Perkin Elmer IR Spectrum Two
Figura 17. Esquema del proceso de dispersión de rayos $X$ según la ley de $B$ ragg. $^{24}$ 77
Figura 18. Esquema del fundamento de los ensayos de reducción de la resazurina. <sup>29</sup> 79
Figura 19. Extrusora de filamento fabricada por el grupo de investigación80
Figura 20. Impresora comercial Prusa i $3$ con la que se obtuvieron las estructuras $81$
Figura 21. Piezas PCL:CMC 95:5 obtenidas a 210°C y 20 mm/s81
Figura 22. Piezas PCL:CMC 95:5 obtenidas a 210°C y 25 mm/s82
Figura 23. Detalle de la formación de una aglomeración de material (PCL:CMC 95:5) a la entrada de la boquilla (zona fría)
Figura 24. Fotografía al microscopio con medidas de la cara superior de una pieza de policaprolactona (Barra de escala: 200 µm)84
Figura 25. Equipo de microCT Bruker SkyScan 117285
Figura 26. Ensayos de compresión llevado a cabo en máquina Zwick Roell Z0.586
Figura 27. Ensayos de flexión llevado a cabo en máquina universal Zwick Roell87



Figura 28. Equipo de plasma Zepto Diener utilizado para la funcionalización de muestras
Figura 29. Estructura química del acemanano90
Figura 30. Sistema de agitación durante el procedimiento de recubrimiento de las piezas con extracto de aloe vera
Figura 31. Estructura química del azul de toluidina-O92
Figura 32. Esquema de las tensiones superficiales que influyen en la formación de una gota sobre una determinada superficie sólida. 46
Figura 33. Contador de células utilizado durante la realización del cultivo celular95
Figura 34. Reacción de reducción del reactivo empleado en el método CCK-896
Figura 35. Fundamento para la cuantificación de células viables mediante el método CCK-8
Figura 36. Microscopio confocal Nikon Eclipse utilizado para la observación de las muestras tras la tinción vivas/muertas



## 3.14. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Codificación y descripción de las formulaciones de material composite propuestas
Tabla 2. Composición del PBS utilizado para la realización del estudio de hidrofilicidad por inmersión
Tabla 3. Tipos de células y ensayos de seguimiento utilizados en la evaluación biológica de los materiales composites propuestos
Tabla 4. Diámetro de filamento para cada uno de los materiales evaluados80
Tabla 5. Tipos de células y ensayos de seguimiento utilizados en la evaluación biológica de los materiales composites propuestos



Capítulo 4. Evaluación de la celulosa microcristalina como aditivo.

## CONTENIDO

4.1. Introducción
4.2. Propiedades de flujo de mezclas de policaprolactona y celulosa microcristalina $107$
4.3. Caracterización de láminas de material composite policaprolactona:celulosa microcristalina
4.3.1. Análisis termogravimétrico y calorimétrico
4.3.2. Retención de tampón fosfato salino (PBS) y agua 115
4.3.3. Ángulo de contacto
4.3.4. Análisis cualitativo de la distribución de partículas
4.3.5. Espectroscopía infrarroja
4.3.6. Difracción de Rayos X (DRX)
4.3.7. Ensayos de tracción
4.3.8. Cultivo celular y evaluación de la proliferación celular
4.4. Fabricación de las estructuras tridimensionales
4.5. Caracterización de estructuras tridimensionales Policaprolactona:celulosa microcristalina
4.5.1. Morfología de las estructuras tridimensionales
4.5.1.1. Observación en microCT
4.5.1.2. Porosidad
4.5.2. Ensayos mecánicos
4.5.2.1. Ensayos de compresión
4.5.2.2. Ensayos de flexión en tres puntos
4.5.3. Estudio de la hidrofilicidad mediante el análisis de la absorción de PBS 136
4.5.4. Ensayos biológicos
4.6. Conclusiones
4.7. Bibliografía
4.8. Índice de figuras
4.9. Índice de tablas

## 4.1. INTRODUCCIÓN

Tal como se describió en el Capítulo 2. Revisión del estado del arte, una de las estrategias seguidas para mejorar las propiedades de las estructuras en base policaprolactona destinadas a actuar como soporte de los procesos de regeneración ósea es la utilización de materiales composite en las que se haya añadido un aditivo con un mayor grado de afinidad celular y/o que sea capaz de mejorar las propiedades mecánicas de la estructura.

Siguiendo esta línea, la celulosa microcristalina (MCC) ha sido propuesta como aditivo en este estudio, debido a que se espera que los numerosos grupos hidroxilo presentes en su estructura sean capaces de proporcionar una mejor afinidad celular que la policaprolactona.

Figura 1. Estructura de las unidades monoméricas de la celulosa microcristalina.

En este capítulo se incluye un análisis de las propiedades de flujo de mezclas de policaprolactona y celulosa microcristalina en diferentes proporciones a fin de obtener un modelo de viscosidad en el rango de temperaturas y velocidades de cizalla adecuados para llevar a cabo la extrusión térmica del material. A continuación, se describe la caracterización de muestras de composite obtenidas mediante moldeo por compresión en términos de análisis cualitativo de la distribución de las partículas de aditivo en el seno de la matriz termoplástica, el efecto de la introducción del mismo en cuanto a la cristalinidad de la matriz a través del estudio del espectro infrarrojo de las distintas combinaciones así como su comportamiento térmico y su patrón de difracción de rayos X. Se determinaron, además, las propiedades mecánicas a tracción del material macizo a fin de poder realizar posteriormente una evaluación más completa del comportamiento de las estructuras tridimensionales obtenidas mediante impresión. También se analizó la hidrofilicidad de estos materiales mediante la medición de su ángulo de contacto y la determinación gravimétrica de la retención de tampón fosfato salino (PBS) y agua.

Por su parte, las estructuras tridimensionales se analizaron desde el punto de vista morfológico, mecánico, biológico y en términos de hidrofilicidad. Los resultados de estos ensayos han permitido obtener conclusiones acerca del potencial de la aditivación de la policaprolactona con celulosa microcristalina para la obtención de piezas susceptibles de ser utilizadas en aplicaciones para regeneración de tejido óseo.



## 4.2. PROPIEDADES DE FLUJO DE MEZCLAS DE POLICAPROLACTONA Y CELULOSA MICROCRISTALINA

Tal y como se especificó en el *Capítulo 3 Formulación de materiales y métodos de caracterización*, para obtener los datos de viscosidad de los fundidos de materiales híbridos analizados, es necesario determinar el factor de corrección de Rabinowitsch-Mooney, que se define como la pendiente de la representación logarítmica de la tensión de cizalla frente a la velocidad de cizalla aparente:

$$b = \frac{dln\sigma_w}{dln\dot{\gamma}_{ap}}$$

#### Donde:

b es el factor de corrección de Rabinowitsch-Mooney

 $\sigma_w$  es la tensión de cizalla corregida, que para el reómetro experimental utilizado se aproxima a la aparente

 $\dot{\gamma}_{an}$  es la velocidad de cizalla aparente

En la Tabla 1 se muestran los valores que adquiere este factor de corrección para cada uno de los materiales y temperaturas evaluados.

Material	Temperatura (°C)	b	R <sup>2</sup>
PCL	170	0,2371	0,9304
PCL	190	0,2921	0,9845
PCL	210	0,3793	0,9940
PCL:MCC 98:2	170	0,2253	0,9893
PCL:MCC 98:2	190	0,2626	0,9880
PCL:MCC 98:2	210	0,3102	0,9884
PCL:MCC 95:5	170	0,2297	0,9871
PCL:MCC 95:5	190	0,2641	0,9839
PCL:MCC 95:5	210	0,3032	0,9815
PCL:MCC 90:10	170	0,2135	0,9905
PCL:MCC 90:10	190	0,2316	0,9912
PCL:MCC 90:10	210	0,2840	0,9961

Tabla 1. Valores del factor de corrección de Rabinowitsch-Mooney para cada una de las combinaciones de materiales y temperaturas evaluadas.



El factor de corrección de Rabinowitsch-Mooney cuantifica la desviación del flujo del modelo newtoniano. De esta forma, un valor de este parámetro igual a 1 se identificaría con el modelo ideal. Por tanto, valores cercanos a la unidad son indicativos de un flujo que se aproxima a este modelo. Para los materiales analizados, se comprueba que la introducción de la celulosa microcristalina proporciona valores más bajos que los de la policaprolactona sola a igual temperatura (Tabla 1), lo que significa que el modelo de flujo de los composites se aleja más del ideal newtoniano que el correspondiente a la policaprolactona.

A partir de estos valores del factor de corrección de Rabinowitsch-Mooney y de los datos de velocidad de cizalla aparente es posible determinar los valores de velocidad de cizalla corregida:

$$\dot{\gamma}_{co} = \left(\frac{3b+1}{4b}\right) \cdot \dot{\gamma}_{ap}$$

A su vez, los datos de velocidad de cizalla corregida permiten obtener, tal como se describió en el Capítulo 3. Formulación de materiales y métodos de caracterización, los valores de viscosidad de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\eta = \frac{\sigma_{ap}}{\dot{\gamma}_{co}}$$

De esta forma, para cada uno de los materiales y temperaturas evaluados, es posible obtener datos de viscosidad para diferentes velocidades de cizalla. La correlación de estos datos permite obtener la isoterma  $\eta = f(\dot{\gamma}_{co})$ . A continuación se muestran, a modo de ejemplo, los valores de la isoterma de la combinación de policaprolactona y celulosa microcristalina al 5% (PCL:MCC 95:5).

Velocidad de cizalla corregida (s <sup>-1</sup> )	Viscosidad (Pa·s)
1675	235
6283	98
12567	56
18850	41
37700	24

Tabla 2. Valores de velocidad de cizalla corregida y viscosidad para la isoterma de 190°C para el material PCL:MCC

En la Tabla 3 se muestran los parámetros de ajuste del modelo potencial para cada uno de los materiales analizados y las isotermas de 170°C, 190°C y 210°C.

$$\eta = a \cdot \dot{\gamma}_{co}^n$$



Material	Temperatura (°C)	a	n	R <sup>2</sup>
PCL	170	70186	-0,750	0,9983
PCL	190	45763	-0,708	0,9973
PCL	210	18163	-0,621	0,9977
PCL:MCC 98:2	170	93945	-0,775	0,991
PCL:MCC 98:2	190	60117	-0,737	0,9985
PCL:MCC 98:2	210	37077	-0,692	0,9982
PCL:MCC 95:5	170	85444	-0,770	0,9988
PCL:MCC 95:5	190	57637	-0,736	0,9979
PCL:MCC 95:5	210	38628	-0,697	0,9964
PCL:MCC 90:10	170	104380	-0,788	0,9993
PCL:MCC 90:10	190	82043	-0,768	0,9992
PCL:MCC 90:10	210	46958	-0,716	0,9994

Tabla 3. Valores de los parámetros de ajuste y regresión de las ecuaciones potenciales de las isotermas evaluadas para la policaprolactona y los composites basados en mezclas PCL:MCC.

Tal como puede comprobarse en la Tabla 3, para todas las temperaturas evaluadas, los parámetros de ajuste (a y n) presentan valores menores cuando el material es puro. Esto implica que este material tiene una viscosidad menor para el rango de velocidades de cizalla evaluado trabajando a la misma temperatura. El incremento del índice de ley potencial (n) ha sido utilizado por otros autores en trabajos previos como indicativo del incremento de la viscosidad en composites cuando se introduce una carga en una matriz polimérica.<sup>1</sup>

Esta tendencia se justifica teniendo en cuenta que la presencia de las partículas de celulosa microcristalina dificulta el flujo al tratarse de un material no termoplástico. Sin embargo, es posible observar que los valores de los parámetros para las mezclas que contienen un 2% y un 5% de aditivo no se incrementan conforme lo hace la concentración para las temperaturas de 170°C y 190°C, pero sí para 210°C. Este comportamiento fluctuante no es frecuente en materiales composites, si bien Güldas y colaboradores describen un efecto similar en una matriz de polipropileno cargada con colemanita. No obstante, es necesario tener en consideración que la variación entre los valores del índice de ley potencial para las mezclas que contienen un 2 y un 5% de celulosa microcristalina es inferior al 1% para las tres temperaturas (un 0,6% a 170°C, un 0,1% a 190°C y un 0,7% a 210°C). A modo de ejemplo, en la Figura 2 es posible observar las isotermas, a 210°C, de la policaprolactona y sus composites con celulosa microcristalina. En esta figura es posible destacar que las curvas correspondientes a los materiales PCL:MCC 95:5 y PCL:MCC 98:2 se encuentran prácticamente superpuestas. Por consiguiente, es más adecuado concluir que el cambio de concentración entre el 2 y el 5% no tiene un efecto apreciable sobre las isotermas de viscosidad.



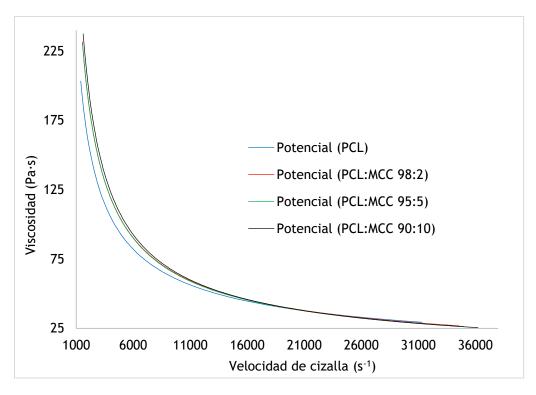


Figura 2. Isotermas de PCL, PCL:MCC 98:2, PCL:MCC 95:5 y PCL:MCC 90:10 a una temperatura de 210°C.

Por su parte, si el material contiene un 10% de aditivo sí se observa, para los valores de temperatura analizados, que los valores de viscosidad que definen la isoterma son superiores a los de las mezclas de menor concentración. De hecho, las variaciones del índice de la ley potencial con respecto a los valores de las mezclas con un 5% de celulosa microcristalina son de un 2%, un 4% y un 3% para 170°C, 190°C y 210°C, respectivamente.

Además del ajuste de los datos a isotermas obtenidas aplicando la ley potencial, se realizó una modelización más completa que permitiera obtener una expresión que tenga en cuenta simultáneamente la dependencia de la viscosidad con la temperatura y la velocidad de cizalla.

Los modelos de ajuste utilizados fueron el exponencial y el de segundo orden. La temperatura de referencia utilizada en todos los casos fue la temperatura de transición vítrea de la policaprolactona (-53°C).

Para realizar el ajuste de los datos se empleó la herramienta *cftool* del software de cálculo Matlab 2015 con el algoritmo de ajuste de Región de confianza. En la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6 se muestran los valores de los parámetros de ajuste de los datos experimentales a los dos modelos teóricos evaluados junto a su correspondiente valor del coeficiente de correlación, indicativo de la bondad del ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos.



En la siguiente tabla (Tabla 4) se muestran los valores de los parámetros de ajuste de la ecuación exponencial:

$$\eta = A \cdot \exp\left(\frac{T_r}{T}\right) \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$$

Material	A	n	R <sup>2</sup>
PCL	1,600·10 <sup>4</sup>	0,3578	0,9542
PCL:MCC 98:2	2,626·10 <sup>4</sup>	0,3064	0,9745
PCL:MCC 95:5	2,501·10 <sup>4</sup>	0,3082	0,9833
PCL:MCC 90:10	3,796⋅10⁴	0,2653	0,9831

Tabla 4. Valores de los parámetros de ajuste de la policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina para el modelo exponencial.

Tal como ocurría en el caso de las isotermas, el factor preexponencial se ve incrementado con la introducción del aditivo. Para el caso de las mezclas PCL:MCC 98:2 y PCL:MCC 95:5 la diferencia de este parámetro es inferior al 5% (tomando como referencia el valor de la mezcla que contiene un 2% de celulosa microcristalina); mientras que la diferencia entre el valor correspondiente a la mezcla PCL:MCC 95:5 y la combinación PCL:MCC 90:10 supone el 52% del valor del primero. Por consiguiente, se comprueba una dependencia no lineal entre los valores de ajuste de los parámetros del modelo y la cantidad de aditivo introducido en la formulación.

En el caso del modelo de segundo orden, los valores de los coeficientes de correlación son superiores a los obtenidos para el modelo exponencial (Tabla 6). Tal como se explicó en el *Capítulo 3. Formulación de materiales y métodos de caracterización*, la formulación matemática del modelo de segundo orden permite que la ecuación se ajuste bastante bien a los fenómenos típicos de los fundidos poliméricos, como la convergencia de las curvas isocinéticas al incrementar la temperatura, así como la convergencia de las isotermas al aumentar la velocidad de cizalla, si bien la gran desventaja de este modelo es la falta de una base teórica para el desarrollo matemático.<sup>2</sup> Por esta razón, la comparativa entre los parámetros de ajuste de los diferentes materiales evaluados (Tabla 5 y Tabla 6) no permite obtener conclusiones sobre el efecto de los aditivos en las propiedades de flujo.

$$\ln(\eta) = a + b \cdot \ln \dot{\gamma} + c \cdot T + d \cdot (\ln \dot{\gamma})^2 + e \cdot T \cdot \ln \dot{\gamma} + f \cdot T^2$$

Material	a	b	С	d
PCL	8,313	-1,494	0,03147	-0,03602
PCL:MCC 98:2	31,9	-1,116	-0,07838	-0,0273
PCL:MCC 95:5	25,95	-0,8737	-0,0585	-0,03316
PCL:MCC 90:10	15,68	-1,325	-0,004378	-0,01137

Tabla 5. Valores de los parámetros de ajuste de la policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina para el modelo de segundo orden.



Material	е	f	R <sup>2</sup>
PCL	0,003102	-7,017·10 <sup>-5</sup>	0,9981
PCL:MCC 98:2	0,001879	6,165·10 <sup>5</sup>	0,9998
PCL:MCC 95:5	0,001581	4,421·10 <sup>-5</sup>	0,9998
PCL:MCC 90:10	0,001667	-1,564·10 <sup>-5</sup>	0,9994

Tabla 6. Valores de los parámetros de ajuste de la policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina para el modelo de segundo orden (Continuación).

La comparativa de los coeficientes de correlación para cada material permite escoger el modelo que mejor se ajusta al comportamiento de cada uno de los materiales analizados (Tabla 7). Para todos los casos, el modelo de segundo orden se ajusta mejor a los datos experimentales obtenidos en este estudio.

Material	Modelo	R <sup>2</sup>
PCL	Exponencial	0,9542
PCL	Segundo orden	0,9981
PCL:MCC 98:2	Exponencial	0,9745
PCL:MCC 98:2	Segundo orden	0,9998
PCL:MCC 95:5	Exponencial	0,9833
PCL:MCC 95:5	Segundo orden	0,9998
PCL:MCC 90:10	Exponencial	0,9831
PCL:MCC 90:10	Segundo orden	0,9994

Tabla 7. Coeficientes de correlación de cada modelo para las diferentes combinaciones de policaprolactonacelulosa microcristalina evaluadas.

A continuación se muestran, como conclusión, las ecuaciones,  $\eta = f(T, \dot{\gamma})$ , que se proponen como más adecuadas para la modelización del comportamiento de flujo de los composites analizados.

Ecuación para modelizar la policaprolactona:

$$\ln(\eta) = 8.313 - 1.494 \cdot \ln \dot{\gamma} + 0.03147 \cdot T - 0.03602 \cdot (\ln \dot{\gamma})^2 + 0.003102 \cdot T \cdot \ln \dot{\gamma} - 7.017 \cdot 10^{-5} \cdot T^2$$

Ecuación para modelizar la mezcla PCL:MCC 98:2:

$$\ln(\eta) = 31.9 - 1.116 \cdot \ln \dot{\gamma} - 0.07838 \cdot T - 0.0273 \cdot (\ln \dot{\gamma})^2 + 0.001879 \cdot T \cdot \ln \dot{\gamma} + 6.165 \cdot 10^{-5} \cdot T^2$$

Ecuación para modelizar la mezcla PCL:MCC 95:5:

$$\ln(\eta) = 25,95 - 0,8737 \cdot \ln \dot{\gamma} - 0,0585 \cdot T - 0,03316 \cdot (\ln \dot{\gamma})^2 + 0,001581 \cdot T \cdot \ln \dot{\gamma} + 4,421 \cdot 10^{-5} \cdot T^2$$



Ecuación para modelizar la mezcla PCL:MCC 90:10:

$$\ln(\eta) = 15,68 - 1,325 \cdot \ln \dot{\gamma} + -0,004378 \cdot T - 0,01137 \cdot (\ln \dot{\gamma})^2 + 0,001667 \cdot T \cdot \ln \dot{\gamma} - 1,564 \cdot 10^{-5} \cdot T^2$$

Estas ecuaciones pueden ser utilizadas para realizar un estudio teórico de simulación del comportamiento de los materiales bajo diferentes condiciones de procesado, lo que podría ser de utilidad para optimizar su procesado mediante otras técnicas térmicas diferentes a la fabricación aditiva mediante extrusión térmica empleada en este trabajo.

# 4.3. CARACTERIZACIÓN DE LÁMINAS DE MATERIAL COMPOSITE POLICAPROLACTONA: CELULOSA MICROCRISTALINA

Tal como se explicó en el *Capítulo 3. Formulación de materiales y métodos de caracterización*, la evaluación de las propiedades de láminas de material composite obtenidas mediante moldeo por compresión se realizó como complemento a la caracterización de las estructuras porosas tridimensionales obtenidas por fabricación aditiva. El empleo de este complemento se justifica porque las características de algunas de las técnicas empleadas hacen poco práctica su aplicación sobre las estructuras porosas (como puede ser la medición del ángulo o el análisis del espectro infrarrojo) y para comparar el efecto que tiene el método de fabricación sobre las propiedades del material (ensayos mecánicos y caracterización biológica). A continuación se presentan los resultados obtenidos para estos ensayos.

#### 4.3.1. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO Y CALORIMÉTRICO

La temperatura de máxima velocidad de degradación disminuye con la introducción del aditivo (Tabla 8), pasando de los 430°C para la policaprolactona, a los 424°C para todos los composites evaluados. La tendencia al descenso de la temperatura de máxima velocidad de degradación cuando se añade un aditivo de naturaleza celulósica en una matriz de policaprolactona ha sido descrita anteriormente en la literatura utilizando, por ejemplo, residuos agrícolas³ o fibra de sisal.⁴

Por otra parte, se observa un incremento de la temperatura de fusión del material, desde los 63°C de la policaprolactona pura a los 70°C de la combinación que contiene un 5% de celulosa microcristalina y a los 68°C para las combinaciones que contienen un 2 y un 10% de aditivo.

Por tanto, el rango de temperatura entre la fusión del material y su degradación es lo suficientemente amplio como para permitir su conformado mediante técnicas térmicas, como es la fabricación aditiva mediante extrusión térmica alimentada por hilo que se propone en el presente trabajo.

Con respecto a los valores de la entalpía de fusión que se presentan, cabe destacar un comportamiento similar al observado en el caso de los valores de temperatura de fusión: existe un ligero incremento cuando se introduce un 2% de aditivo (pasando el valor de este parámetro de los 33 J/g a los 39 J/g), el máximo se presenta para las muestras que contienen un 5% de celulosa microcristalina (43 J/g) y



para un 10% de contenido en esta sustancia, se observa una disminución del valor (38J/g), si bien continúa siendo superior al dato para la matriz sin aditivar.

Los valores de entalpía de fusión se han utilizado, además, para calcular la cristalinidad de la matriz a través de la expresión siguiente:

$$X_c = \left(\frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0 \cdot (1 - x_{MCC})}\right) \cdot 100$$

Donde  $X_c$  es la fracción cristalina de la matriz,  $\Delta H_m$  es el valor de entalpía de fusión determinado experimentalmente en este trabajo,  $\Delta H_m^0$  es el valor de la entalpía de fusión de una muestra de policaprolactona 100% cristalina (142,0 J/g)  $^5$  y x<sub>MCC</sub> es el valor de la fracción de aditivo introducido en la formulación. Tal y como ocurre con la entalpía de fusión, la cristalinidad de los materiales composites se incrementa para las concentraciones de un 2 y un 5% de MCC y desciende ligeramente con respecto a estos valores cuando la concentración de este aditivo se aumenta hasta el 10%, aunque continúa siendo superior al dato obtenido para la policaprolactona pura.

Esta tendencia se explica teniendo en cuenta que la introducción de material particulado, como es la MCC, en una matriz termoplástica puede incrementar la cristalinidad de la misma si las partículas actúan como puntos de formación de núcleos cristalinos.

A la vista de los datos presentados en la Tabla 8, este fenómeno tiene lugar al aditivar la policaprolactona con partículas de celulosa microcristalina. Sin embargo, debido a la formación de aglomerados de partículas que se forman cuando se incrementa la concentración de aditivo (Figura 6), muchas de las partículas no tienen un contacto interfacial suficiente con la matriz cuando se incrementa la concentración de celulosa microcristalina. Esta limitación de contacto interfacial reduce el efecto de nucleación descrito y, por tanto, el composite que contiene un 10% de aditivo presenta una cristalinidad menor (Tabla 8).

Material	Temperatura de máxima degradación (°C)	Temperatura de fusión (°C)	Entalpía de fusión (J/g)	Cristalinidad (%)
PCL	430	63	33	23
PCL:MCC 98:2	424	68	39	28
PCL: MCC 95:5	424	70	43	31
PCL: MCC 90:10	424	68	38	30

Tabla 8. Valores de temperatura de máxima degradación, temperatura de fusión, entalpía de fusión y cristalinidad de la policaprolactona, la celulosa microcristalina y sus combinaciones.

Por otra parte, tal como se explicó en el *Capítulo 3. Formulación de materiales* y *métodos de caracterización* es posible valorar la pérdida de peso a 150°C como el porcentaje de agua desorbida y, por tanto, analizar la capacidad de retención de agua de estos materiales con una gran exactitud. Este análisis se realizó sobre muestras que habían permanecido inmersas en agua 48 horas, asegurando así haber alcanzado el



equilibrio de hinchado de las muestras, de acuerdo con los resultados que se presentan en el apartado siguiente (Retención de tampón fosfato salino y agua).

En la Figura 3, se muestran los valores obtenidos durante este análisis. En esta gráfica es posible comprobar la relación lineal que existe entre la cantidad de agua retenida en las muestras y el porcentaje de celulosa microcristalina introducido en la formulación. Esta relación confirma el efecto de incremento de la hidrofilicidad de la matriz ejercido por el aditivo.

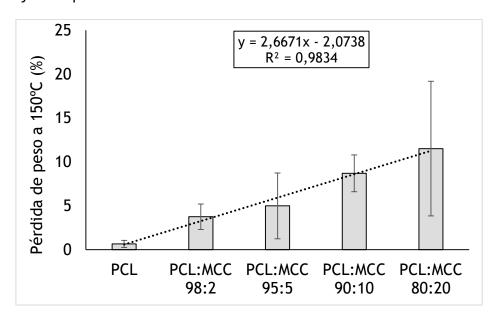


Figura 3. Correlación de pérdida de peso a 150°C (evaluada mediante TGA) y la cantidad de celulosa microcristalina introducida en la matriz de policaprolactona.

### 4.3.2. RETENCIÓN DE TAMPÓN FOSFATO SALINO (PBS) Y AGUA

Los resultados obtenidos para las muestras macizas en lámina de retención de agua y PBS se muestran en las Figura 4 y Figura 5. Estos datos muestran que la celulosa microcristalina incrementa la hidrofilicidad de las muestras y que este aumento está relacionado con la cantidad de aditivo introducida en la formulación. Este incremento se observa incluso para cortos períodos de tiempo. A modo de ejemplo, durante la primera hora de inmersión en PBS, las muestras de PCL absorben únicamente el 0,19% en peso de este fluido con respecto a su masa inicial seca, mientras que las muestras que contienen un 20% de celulosa microcristalina (PCL:MCC 80:20) son capaces de retener un 1,14%, lo que supone 6 veces la cantidad retenida por la policaprolactona.

Esta característica del material composite proporciona una diferencia importante con otras estrategias propuestas en la literatura para incrementar la afinidad por el agua de la policaprolactona. A modo de ejemplo, Liu y colaboradores<sup>6</sup> desarrollaron un composite basado en policaprolactona reforazada con fibra de vidrio que mostraba un incremento notable en la retención de agua tras varios días de inmersión, pero que no proporcionaba diferencias para períodos inferiores a un día.

Con respecto al tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de hinchado, cabe destacar que no existe diferencia significativa (p>0,05) entre los valores de retención



a 24 horas y a 48 horas. Por consiguiente, es posible confirmar que a 24 horas el material alcanza el equilibrio de hinchando tanto en agua como en PBS.

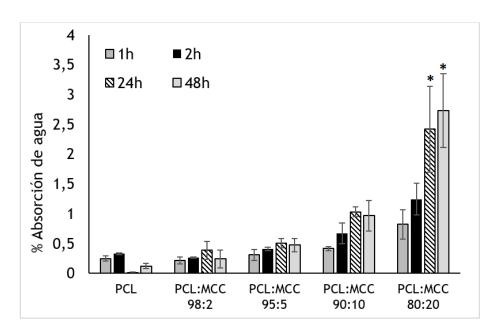


Figura 4. Absorción de agua para la policaprolactona y sus composites para 1h, 2h, 24h y 48h de inmersión (\*p<0,05 comparado con el grupo equivalente de muestras de policaprolactona).

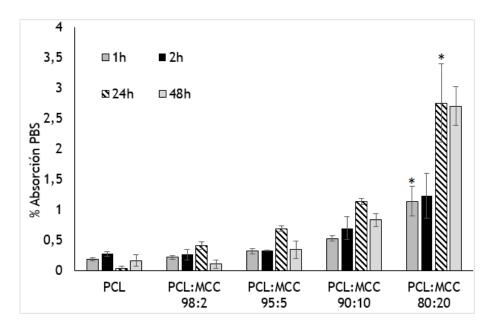


Figura 5. Absorción de PBS para la policaprolactona y sus composites para 1h, 2h, 24h y 48h de inmersión (\*p<0,05 comparado con el grupo equivalente de muestras de policaprolactona).



# 4.3.3. ÁNGULO DE CONTACTO

En la Tabla 9 se muestran los valores del ángulo de contacto tanto sobre la superficie seca como sobre la superficie prehumedecida. En el caso de las muestras secas, los valores no tienen una diferencia significativa (p>0,05) y no existe una tendencia de modificación de este parámetro como consecuencia de la introducción del aditivo. Para las muestras prehumedecidas, si bien sigue sin existir una diferencia significativa entre los valores en términos estadísticos (p>0,05) sí puede observarse una tendencia de disminución inicial para las muestras con un bajo contenido en celulosa microcristalina (p>0,05) seguido de un ligero incremento del valor promedio calculado para las muestras que contienen una mayor cantidad de este aditivo (p>0,05).

Material	Ángulo de contacto sobre muestras secas	Ángulo de contacto sobre muestras prehumedecidas
PCL	88,5 ± 4,6°	82,4 ± 4,3°
PCL:MCC 98:2	86,5 ± 6,7°	82,0 ± 4,0°
PCL:MCC 95:5	89,6 ± 5,7°	81,6 ± 3,0°
PCL:MCC 90:10	87,9 ± 2,0°	84,1 ± 5,4°
PCL:MCC 80:20	90,3 ± 8,5°	83,2 ± 4,5°

Tabla 9. Valores del ángulo de contacto en muestras secas y prehumedecidas.

Para explicar simultáneamente estos resultados y los presentados en el apartado anterior en cuanto a la absorción de agua y PBS, es posible considerar la heterogeneidad de la superficie. Tal como se señalará a continuación (Figura 6), no existe una distribución homogénea de las partículas de aditivo en el seno de la matriz termoplástica. Como consecuencia, en la superficie los puntos en los que el aditivo está disponible para ejercer un efecto de aumento de la mojabilidad superficial no son lo suficientemente numerosos para proporcionar una diferencia significativa en las mediciones del ángulo de contacto. Estos puntos superficiales ricos en aditivo, aunque no sean muy numerosos por la mala distribución del mismo, proporcionan una vía de acceso a las moléculas de agua hacia el interior del material para la interacción con los agregados de celulosa internos, de carácter altamente hidrofílico. Por esta razón, las muestras son capaces de absorber una gran cantidad de agua a pesar de no proporcionar una gran diferencia de la hidrofilicidad superficial del material composite.



# 4.3.4. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA DISTRIBUCIÓN DE PARTÍCULAS

Las partículas de celulosa microcristalina tienen una distribución heterogénea en la matriz de policaprolactona, formándose agregados de las mismas tal como puede comprobarse en la Figura 6. Además, dichos agregados no tienen un tamaño uniforme, sino que se diferencian partículas de diversas morfologías y dimensiones. Tal como cabría esperar, estos aglomerados son más numerosos conforme se incrementa la concentración de celulosa microcristalina en la formulación.

Esta distribución heterogénea en la matriz evidencia una escasa afinidad entre los dos componentes que forman el composite, lo que se analizará en el siguiente subapartado de este capítulo (4.3.5. Espectroscopía infrarroja) en base a los espectros del infrarrojo de las diferentes combinaciones evaluadas. La heterogeneidad de la distribución de las partículas en el seno del material puede tener repercusiones a nivel de propiedades mecánicas de las estructuras impresas, así como en la procesabilidad del material.

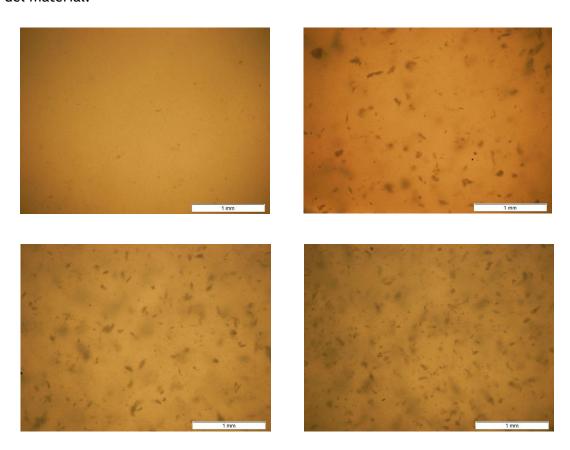


Figura 6. Fotografías al microscopio óptico de la distribución de partículas de celulosa microcristalina (PCL, PCL:MCC 98:2, PCL:MCC 95:5; PCL:MCC 90:10). Escala: 1 mm.

Es necesario tener en consideración que en el filamento que se obtiene para alimentar la impresora tridimensional, el tamaño de partícula de los aglomerados se verá reducido gracias al mezclado adicional que tiene lugar durante la extrusión, si bien este estudio cualitativo de la distribución de partículas en las láminas obtenidas por compresión da una idea de la escasa interacción entre la matriz y el aditivo y la gran tendencia de este último a formar aglomerados.



## 4.3.5. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

En el espectro de la celulosa microcristalina pura (Figura 7) se presentan los picos típicos de este compuesto, como son la señal de los grupos hidroxilo entre 3300 y 3600 cm<sup>-1</sup> y la señal a 1030 cm<sup>-1</sup> correspondiente al enlace C-O.<sup>7</sup> En el espectro de todos los composites evaluados (Figura 8), así como en el correspondiente a la policaprolactona pura (Figura 7), se observa el pico característico a 1720 cm<sup>-1</sup> que se corresponde con la vibración de tensión del carbonilo del grupo éster<sup>8,9</sup> presente en la estructura de la policaprolactona. Asimismo, también es posible identificar fácilmente los picos a 2946 y 2870 cm<sup>-1</sup> que corresponden con la tensión simétrica del CH<sub>2</sub>.<sup>10</sup>

Teniendo en cuenta la estructura química de los dos componentes, podría esperarse el establecimiento de puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo presentes en la policaprolactona y los grupos hidroxilo presentes en la celulosa microcristalina. La presencia de puentes de hidrógeno podría confirmarse si existiera un pico a 1710 cm<sup>-1</sup> característico de la vibración del carbonilo cuando se encuentra influido por la existencia de puentes de hidrógeno con otros grupos funcionales. <sup>11</sup> Por consiguiente, de acuerdo con los espectros infrarrojo obtenidos en este estudio, parece que no existe interacción intermolecular entre los componentes en los composites propuestos. La ausencia de este tipo de enlaces favorece la formación de los agregados de partículas descritos en el apartado anterior (Figura 6).

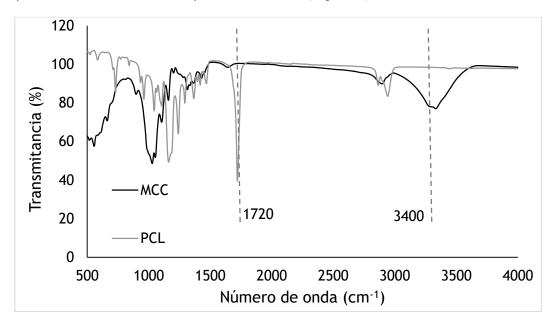


Figura 7. Espectro infrarrojo de policaprolactona y celulosa microcristalina.



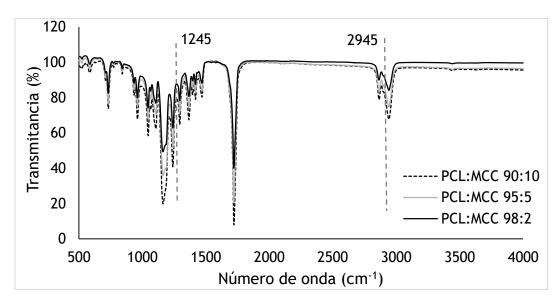


Figura 8. Espectro infrarrojo de las combinaciones de policaprolactona y celulosa microcristalina.

Por otra parte, la evaluación de la cristalización de la policaprolactona y sus mezclas mediante el análisis del espectro infrarrojo es una estrategia que ha sido valorada por diferentes autores. <sup>11,12</sup> En el presente estudio, esta técnica complementa al análisis calorimétrico que se describe en apartados posteriores. Para ello, se ha evaluado cómo la introducción de la celulosa microcristalina cambia la relación de áreas de dos picos relacionados con las fases cristalina y amorfa de la policaprolactona. El pico de tensión asimétrica del grupo CH<sub>2</sub> (2945 cm<sup>-1</sup>) es un pico de intensidad media en fase amorfa y muy débil en el caso de la fase cristalina. De forma similar, el pico de tensión simétrica del grupo C-O-C (1245 cm<sup>-1</sup>) tiene intensidad media cuando se encuentra en fase cristalina y débil en fase amorfa<sup>13</sup>.Por consiguiente, un cambio en la relación de áreas de estas dos señales será un indicativo de cambios en la cantidad relativa de ambas fases y, en consecuencia, en la cristalinidad de la matriz.

En la Tabla 10 se observa que el valor de esta relación disminuye al introducir el aditivo en la formulación. El valor mínimo se da en el grupo de muestras que contiene un 2% de aditivo, mientras que las muestras que contienen un 5 y un 10% presentan valores mayores de esta relación, si bien son inferiores en todos los casos a los de la matriz sin aditivar.

Esta disminución se relaciona con un incremento relativo del área del pico C-O-C (identificativo de la fase cristalina) con respecto al área del pico del grupo CH<sub>2</sub>. Esta tendencia está en consonancia con los resultados proporcionados por el análisis termogravimétrico (Tabla 8) y permite confirmar un incremento de la cristalinidad de la matriz debido a la presencia del aditivo, siendo este efecto más importante para bajas concentraciones de celulosa microcristalina.



Material	Relación de áreas (pico CH <sub>2</sub> / pico C-O-C)
PCL	1,34
PCL:MCC 98:2	1,08**
PCL:MCC 95:5	1,19*
PCL:MCC 90:10	1,14

Tabla 10. Datos de relación de áreas de pico de CH2 y C-O-C (\* p<0,05; \*\* p<0,01, tomando como referencia el conjunto de datos de la PCL pura).

## 4.3.6. DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

En la Figura 9 se muestran los patrones de difracción de rayos X de la policaprolactona y sus composites PCL:MCC. Todos los difractogramas muestran los picos característicos de la PCL a 21,3° y 23,6°, los cuales se corresponden con los planos cristalográficos (110) y (200) de este polímero semicristalino.<sup>14,15</sup>

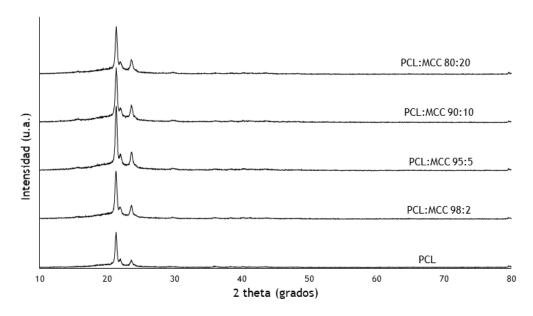


Figura 9. Patrones de difracción de rayos X de la policaprolactona y sus composites con celulosa microcristalina.

No se observan en los patrones de las muestras de composites picos a diferentes valores de 2 theta de los observados para la policaprolactona pura, lo que implica que no se forman nuevos dominios cristalinos por la presencia de las partículas de aditivo. Sin embargo, sí se observa un incremento del área de los picos característicos de la policaprolactona a 21,3° y 23,6°. En la Tabla 11 se muestran los valores de las áreas de esos dos picos para los diferentes materiales evaluados. Como puede comprobarse, ambos valores se incrementan con la introducción de la celulosa microcristalina, con un valor máximo para los composites que contienen un 5% p/p de este aditivo.

Material	Área del pico a 21,3° (u.a.)	Área del pico a 23,6º (u.a.)
PCL	19238	3866
PCL:MCC 98:2	28059	7537
PCL:MCC 95:5	35072	10135
PCL:MCC 90:10	31256	9611
PCL:MCC 80:20	26360	6953

Tabla 11. Área de los principales picos de difracción de rayos X.

La forma más puntiaguda de los picos a 21,3° y 23,6° y su mayor área pueden relacionarse con un incremento de la cristalinidad de la matriz. Esta tendencia está en concordancia con los resultados anteriormente descritos en cuanto al análisis termogravimétrico y el estudio del espectro infrarrojo de los materiales composites PCL:MCC. El efecto de nucleación por la presencia de partículas es contrario al efecto descrito para otros aditivos al ser añadidos en una matriz de policaprolactona, como son la hidroxiapatita<sup>16</sup> o el vidrio bioactivo<sup>17</sup>. Estos aditivos disminuyen la cristalinidad de la matriz debido a que ocluyen los dominios intercristalinos y, por tanto, dificultan el proceso de cristalización. 17,18 Sin embargo, el efecto observado para la celulosa microcristalina también se ha referenciado para otros aditivos, como el talco o las nanopartículas de plata. 19 De esta forma, se comprueba que el efecto del aditivo empleado sobre la cristalinidad de la policaprolactona dependerá de la naturaleza del mismo.

# 4.3.7. ENSAYOS DE TRACCIÓN

En la Tabla 12 se muestran los resultados del ensayo de tracción para láminas obtenidas por moldeo por compresión de policaprolactona y sus composites con celulosa microcristalina. Se observa que los valores del módulo de elasticidad se incrementan con la concentración de aditivo introducido, si bien este aumento no es significativo desde el punto de vista estadístico, de acuerdo con el test multicomparación (criterio Tukey HSD) llevado a cabo (p<0,05).

Este incremento del módulo de elasticidad refleja un comportamiento más rígido en los composites. Como consecuencia, la tensión en el límite elástico disminuye, tal como puede apreciarse en la Tabla 12, siendo esta disminución significativa para las muestras que contienen un 10 y un 20% de celulosa microcristalina. Este cambio de comportamiento dúctil a un comportamiento rígido o cuasirígido en matrices termoplásticas aditivadas es una tendencia común cuando el aditivo no es un termoplástico, 20 dado que las partículas actúan como puntos de discontinuidad de la matriz.



Material	Módulo de elasticidad (MPa)	Límite elástico (MPa)
PCL	224,2±14,4	16,1±0,4
PCL:MCC 98:2	272,8±8,2	15,7±0,5
PCL:MCC 95:5	320,6±19,4	14,8±0,4
PCL:MCC 90:10	323,1±29,7	13,5±0,9*
PCL:MCC 80:20	388,3±30,5**	10,2±0,9**

Tabla 12. Resultados ensayos de tracción láminas obtenidas por compresión de policaprolactona y composites policaprolactona:celulosa microcristalina (\*p<0,05).

La representación del módulo de elasticidad en función de la concentración de aditivo introducido (Figura 10) permite confirmar la dependencia lineal entre ambos parámetros, tal como cabe esperar para este tipo de materiales compuestos. Ji y colaboradores<sup>21</sup> muestran una tendencia similar para el relleno con vidrio bioactivo, pero no referencian los parámetros de la recta que relaciona ambas variables. No obstante, este tipo de correlaciones constituyen una herramienta interesante para diferentes aplicaciones de Ingeniería de Tejidos, como es la fabricación de estructuras con gradientes en las propiedades mecánicas. Dado que la rigidez de estos composites se modifica gradualmente con la concentración de celulosa microcristalina introducida, es posible proponer como línea futura la obtención de estructuras con gradientes de rigidez mediante la variación en la concentración de aditivo. En la bibliografía existen diferentes estudios que establecen la relación entre la rigidez del material soporte y los procesos de diferenciación y migración de células pluripotenciales, <sup>22,23</sup> lo que supone un precedente al interés que podrían tener este tipo de soportes en la regeneración ósea.

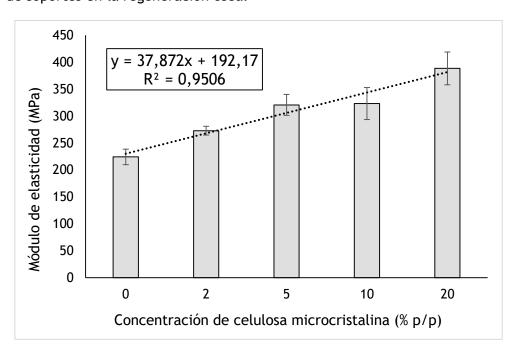


Figura 10. Correlación entre módulo de elasticidad a tracción y concentración de celulosa microcristalina para probetas obtenidas mediante moldeo por compresión.



# 4.3.8. CULTIVO CELULAR Y EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

En este apartado se presentan los resultados de un análisis de citotoxicidad sobre láminas del material composite obtenidas por moldeo por compresión. Estos datos permitirán establecer si el aditivo modifica las propiedades biológicas del material independientemente del tipo de estructura que se valore o, si por el contrario, la presencia del aditivo tiene un efecto diferente según si las muestras analizadas tienen un formato u otro.

Las muestras utilizadas durante este ensayo fueron discos de 10 mm de diámetro troquelados a partir de láminas obtenidas por moldeo por compresión. Estas muestras fueron esterilizadas mediante inmersión en etanol al 70% durante 30 minutos en campana de flujo laminar. Transcurrido este tiempo, se eliminó el etanol y se lavaron las muestras tres veces con PBS y tres veces con medio de cultivo (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium).

Para la evaluación de la afinidad biológica de los materiales propuestos se realizaron cultivos de células de médula ósea de cultivo primario de oveja. Estas células se cultivaron en medio DMEM bajo en glucosa suplementado con 1% penicilinaestreptomicina (10000 U/ml) y 10% en suero fetal de ternera. Tras alcanzar una confluencia del 80%, las células fueron desancladas con tripsina-EDTA (0,5%), contabilizadas y resuspendidas en medio de cultivo.

La siembra de células sobre las muestras se realizó depositando una gota de 50 ul de medio que contienen 30000 células en cada muestra. La placa se incubó durante 1 hora a 37°C para permitir que las células se anclen adecuadamente a las muestras. Posteriormente, se añadieron 750 µl de medio para proporcionar suficiente volumen para un correcto cultivo.

Se evaluó la viabilidad de las células a los días 1, 3 y 8 de la siembra a través del ensayo Presto Blue ®. Para cada uno de los períodos de tiempo indicados, se eliminó el medio de cada pocillo y se sustituyó por una disolución del reactivo Presto Blue ® al 10% en medio. A continuación se incubó durante 30 minutos. Tras la incubación, se tomaron dos alícuotas de cada pocillo para leer la fluorescencia en un lector de placas Tecan Infinite 200 Pro utilizándose una longitud de onda de 540 nm como excitación y de 590 nm como emisión. Como control negativo se utilizaron muestras equivalentes a las utilizadas para el cultivo en las que no se sembraron células pero a las que sí se añadió e incubó el reactivo del ensayo en las mismas condiciones que sobre las muestras del cultivo.

A partir de los datos del ensayo de viabilidad celular que se presentan en la Figura 11, es posible confirmar, en primer lugar, que todos los grupos de muestras son biocompatibles, ya que existe un incremento de la señal de fluorescencia entre los días 1 y 8 de cultivo celular.

Por otra parte, para el día 1 no existe diferencia significativa (p>0,05) entre los valores de fluorescencia obtenidos en las muestras de policaprolactona y las muestras de material composite, de manera que es posible concluir que la presencia del aditivo no influye sobre los procesos de anclaje celular sobre la superficie del material. Entre



los días 1 y 3 es posible observar un descenso generalizado de la señal de fluorescencia, excepto para el control positivo. Es posible que este ligero descenso se deba a que un porcentaje de las células que se anclaron en el día 1 del cultivo lo hicieran de forma deficiente, de tal forma que entre los días 1 y 3 se desanclan de la superficie. En los datos del día 3, es posible observar un incremento de la señal de fluorescencia altamente significativo (p<0,01) en los grupos de muestras que contienen un 5%, un 10% y un 20% de aditivo con respecto al valor obtenido para las muestras de policaprolactona pura.

Sin embargo, en el día 8 no se mantiene la tendencia, ya que solo el control positivo y el grupo de muestras que contiene un 5% de aditivo tiene una fluorescencia significativamente superior (p<0,05) al de las muestras de policaprolactona pura. Las muestras que contienen un 10 y un 20% tienen un valor promedio de fluorescencia inferior al grupo con un 5% de celulosa microcristalina, si bien continúa siendo superior (aunque no significativamente desde el punto de vista estadístico) al de las muestras de policaprolactona. Este comportamiento de dependencia de la afinidad de materiales composites con el porcentaje de aditivo introducido en la formulación ha sido definido en otros casos, como en el empleo de biovidrio en ácido poliláctico <sup>24</sup> o la hidroxiapatita en policaprolactona. 25 Es posible que la disminución de la capacidad de mejorar la proliferación celular observada a altas concentraciones de aditivo se deba a modificaciones en la topografía de las muestras. La topografía de los materiales juega un papel relevante en los procesos de anclaje y proliferación celulares, 26-28 por lo que es posible que este parámetro juegue un papel fundamental para la interpretación de los resultados obtenidos de viabilidad celular (Figura 11). Por otra parte, el grupo de muestras que contiene un 5% de MCC proporciona el menor ángulo de contacto sobre muestras prehumedecidas (81,6 $\pm$ 3,0°, Tabla 9). La mayor humectabilidad de la superficie también puede explicar la mayor afinidad de las células mesenquimales por esta combinación.

Sin embargo, con la información que se ha obtenido en el desarrollo experimental de este estudio no es posible confirmar esta hipótesis ni proponer un mecanismo que explique en profundidad las diferencias en los procesos celulares que tienen lugar en los diferentes grupos de materiales analizados. Este estudio mucho más profundo de los procesos biológicos que definen la bioafinidad de un biomaterial está fuera de los objetivos del trabajo que se presenta, si bien pudiera tratarse de una posible línea de continuación de los resultados obtenidos.

Por consiguiente, es posible concluir que la introducción de la celulosa microcristalina en la formulación de composites de base policaprolactona tiene un efecto positivo en términos de afinidad celular.



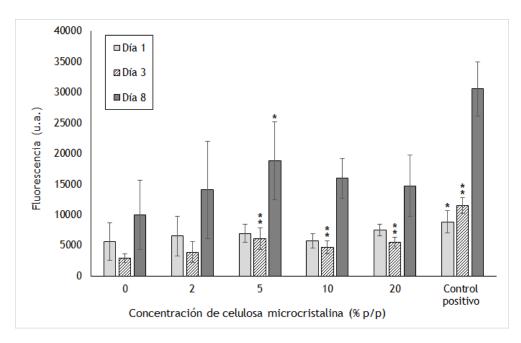


Figura 11. Resultados del ensayo de viabilidad celular para las muestras obtenidas por moldeo por compresión de policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina (\* p< 0,05, \*\*p<0,01 tomando como referencia la policaprolactona pura).

## 4.4. FABRICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES

Tal y como se describió en el *Capítulo 3. Formulación de materiales y métodos de caracterización*, la procesabilidad de las diferentes combinaciones de material composite se evaluó mediante prueba y error de impresión a través de la técnica que se describe en el citado capítulo. De esta forma, si bien las mezclas que contienen un 2 y un 5% no presentan excesivos problemas de fabricación, es necesario mencionar que las del 10% sí muestran un empeoramiento evidente del proceso de deposición, por lo que se situó este valor como concentración máxima admisible para la obtención de piezas impresas de base policaprolactona: celulosa microcristalina.

Por otra parte, como ya se mencionó en el Capítulo 3, los parámetros de fabricación para las estructuras tridimensionales mediante impresión fueron 210°C y 25 mm/s a fin de obtener todas las piezas analizadas en este estudio bajo las mismas condiciones y de esta forma poder realizar un estudio comparativo de las mismas. No obstante, es posible que la fabricación de las combinaciones con celulosa microcristalina (especialmente las que contienen una baja concentración de aditivo) sea viable bajo unas condiciones diferentes. Por tanto, un análisis de cómo afectan las condiciones de procesado a las características de este material composite sería una ampliación interesante al trabajo que se presenta en este capítulo.



# 4.5. CARACTERIZACIÓN DE ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES POLICAPROLACTONA: CELULOSA MICROCRISTALINA

En este apartado se presentan los resultados de los ensayos de caracterización realizados para evaluar las características de las estructuras tridimensionales obtenidas mediante fabricación aditiva con los materiales composite basados en mezclas policaprolactona: celulosa microcristalina. Es posible comparar los datos obtenidos con los correspondientes a las estructuras de policaprolactona pura para de esta forma determinar el efecto del aditivo sobre el material y su potencial para las aplicaciones de Ingeniería de Tejidos relacionadas con la regeneración de hueso.

#### 4.5.1. MORFOLOGÍA DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES

La morfología de las piezas se evaluó mediante dos tipos de técnicas: mediante microscopía electrónica de barrido y mediante microCT. Con la primera de ellas se observó la superficie de las primeras capas de las piezas, mientras que con la segunda se analizó la estructura interna de las mismas.

La observación al microscopio de las piezas impresas de material composite permite confirmar que la mesoestructura es bastante similar a las de la policaprolactona, con poros regulares e interconectados (Figura 12).

Sin embargo, la presencia de la celulosa microcristalina modifica la topografía de las estructuras tridimensionales. La importancia de este efecto depende de forma relevante de la concentración de aditivo presente en las muestras. Así, es posible observar en la Figura 12 que las piezas que contienen un 2% de aditivo presentan una topografía muy similar a las estructuras fabricadas en policaprolactona pura. Por su parte, las muestras que contienen un 5% de celulosa microcristalina tienen una superficie rugosa, si bien la morfología de los filamentos continúa siendo estable. Finalmente, cuando la concentración se incrementa hasta el 10%, la aglomeración de partículas de aditivo dificulta el proceso de deposición. Esta modificación de las condiciones de impresión provoca no solo cambios en la topografía de los filamentos, sino también en su integridad estructural (Figura 12). Esta pérdida de integridad estructural tiene una influencia notable en las propiedades mecánicas de la pieza, tal como se detallará en mayor profundidad en el apartado destinado a la exposición de los resultados de los ensayos mecánicos.

Por otra parte, es posible que los cambios topográficos tengan cierto efecto sobre la capacidad de las células de anclarse en la superficie de los filamentos, así como en su proceso de proliferación.



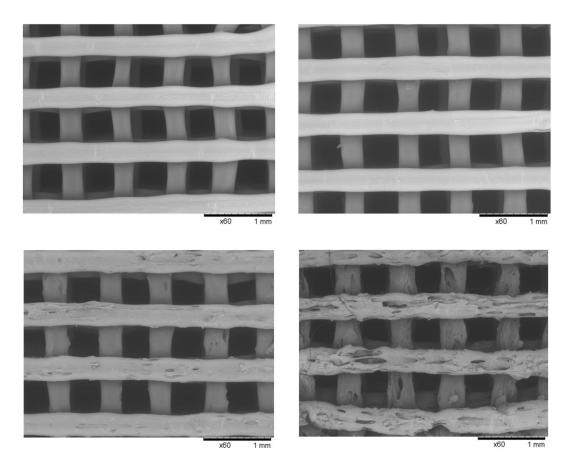


Figura 12. Imágenes al microscopio electrónico PCL, PCL:MCC 98:2 y PCL:MCC 95:5, respectivamente. (Barra de escala: 1 mm)

Como caracterización complementaria de la superficie, se procedió a la medición de los huecos creados en los filamentos de las piezas que contienen un 10% de celulosa microcristalina como consecuencia del empeoramiento de las condiciones de deposición (Figura 13). La forma de estos poros superficiales es alargada y en la dirección longitudinal de los filamentos, lo que evidencia que se han formado como consecuencia de problemas de flujo durante el proceso de deposición.

Se realizaron 29 medidas del ancho y de la longitud de estos huecos (Figura 13) y se determinó la relación Longitud/Ancho. Siguiendo este procedimiento, se determinó que la longitud promedio de estos huecos es de 239±95 µm, su ancho promedio es 71±32 µm y la relación entre ambas magnitudes, 3,8±1,9. Como puede apreciarse, las desviaciones tanto de la longitud como del ancho son superiores al 30% del promedio. Este valor es un indicativo del alto grado de heterogeneidad de estos poros superficiales.

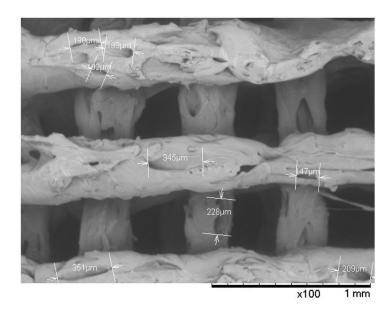


Figura 13. Medición de los huecos de los filamentos en piezas que contienen un 10% de MCC (Escala: 1 mm).

## 4.5.1.1. OBSERVACIÓN EN MICROCT

La observación de la estructura interna de las piezas impresas mediante microtomografía computerizada de rayos X (microCT) (Figura 14 y Figura 15) permite confirmar las observaciones realizadas de forma superficial con la microscopía electrónica (Figura 12): la mesoestructura de las piezas fabricadas con material composite es muy similar a la de las piezas de policaprolactona cuando la concentración de aditivo es baja (2 ó 5% p/p).

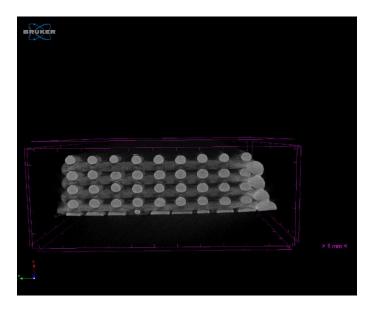


Figura 14. Fotografía pieza impresa de PCL (Escala: 1 mm).



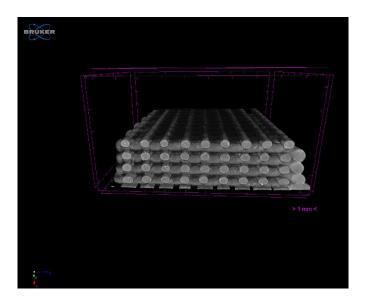


Figura 15. Fotografía pieza impresa de PCL:MCC 98:2 (Escala: 1 mm).

La observación mediante microCT de la estructura interna de las piezas que contienen un 10% de aditivo permite corroborar las conclusiones extraídas a partir de las imágenes de la cara superior de las piezas realizadas por microscopía: con una concentración tan alta de celulosa microcristalina se crean múltiples oquedades que disminuyen la adhesión entre capas, comprometiendo la estabilidad estructural de las piezas obtenidas mediante impresión 3D (Figura 16).

Estos huecos que se crean como consecuencia de la presencia del aditivo también existen en las piezas que contienen un 5% de celulosa microcristalina, si bien su presencia no es tan abundante y, por ello, no llega a desestabilizar la mesoestructura de la pieza.

Si se relacionan estas observaciones acerca de la estabilidad de los filamentos con los datos de viscosidad presentados en el apartado 4.2. Propiedades de flujo de mezclas de policaprolactona y celulosa microcristalina, es posible comprobar que el incremento de la viscosidad evidenciado por el aumento del factor preexponencial del modelo exponencial tiene un papel relevante en cuanto a la calidad de la deposición.

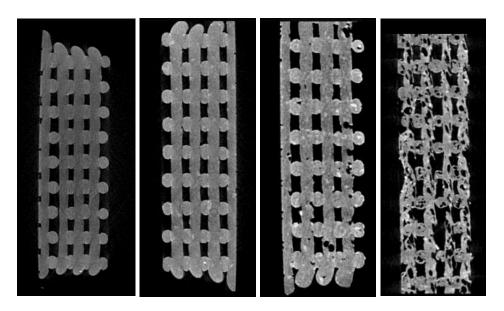


Figura 16. Secciones transversales de piezas impresas (de izquierda a derecha: PCL, PCL:MCC 98:2, PCL:MCC 95:5 y PCL:MCC 90:10).

#### 4.5.1.2. POROSIDAD

En este apartado se analizarán, en primer lugar, los datos de densidad del material macizo obtenidos según el procedimiento detallado en el *Capítulo 3*. *Formulación de materiales y métodos de caracterización*. Estos resultados, además de ser necesarios para el posterior cálculo de los valores de porosidad de las estructuras tridimensionales, dan información sobre la influencia de la presencia de las partículas de aditivo sobre las propiedades de la matriz.

Tal como puede comprobarse en la Tabla 13, la densidad del material se incrementa de forma significativa cuando se introduce la celulosa microcristalina como aditivo con respecto a la policaprolactona pura. La densidad de la celulosa microcristalina pura es de 0,6 g/cm³, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.<sup>29</sup> Este valor es inferior al de la policaprolactona, de tal forma que si el aditivo no afectara a las características de la matriz, el valor de la densidad de los composites debería ser menor, lo que es opuesto a los resultados que se muestran. Por consiguiente, es posible confirmar que la presencia de la celulosa microcristalina afecta a las características de la matriz de policaprolactona. Una tendencia similar de incremento de la densidad con la concentración de aditivo ha sido referenciado en la formulación de otros composites mediante la introducción de aditivos celulósicos en matrices termoplásticas, como es el caso del serrín procedente de *Pinus elliotti* sobre matriz de polipropileno.<sup>30</sup>

Los datos de cristalinidad obtenidos durante el análisis termogravimétrico de los materiales analizados muestran que este parámetro se incrementa para bajas concentraciones de MCC y posteriormente decae ligeramente, aunque se mantiene por encima del valor para la policaprolactona pura (Tabla 8). Una tendencia similar se observa con los valores de densidad (Tabla 13), por lo que es posible correlacionar ambas tendencias para justificar que el aumento de la densidad tiene su origen en el aumento de la cristalinidad de la matriz de PCL. La relación entre densidad y cristalinidad se justifica por el mayor grado de empaquetamiento de las cadenas



poliméricas cuanto mayor es la cristalinidad del material. De hecho, la relación entre estas dos magnitudes puede ser empleada como forma de determinar la cristalinidad de una muestra.<sup>31</sup>

Material	Densidad (g/cm³)
PCL	1,10±0,02
PCL:MCC 98:2	1,16±0,03**
PCL:MCC 95:5	1,23±0,02***
PCL:MCC 90:10	1,13±0,02**

Tabla 13. Datos de densidad de la policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina (\* p<0,05; \*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001 tomando como referencia el conjunto de datos de la PCL pura).

En cuanto a los datos de densidad aparente de las estructuras tridimensionales, estos se sitúan entre 0,48 y 0,53 g/cm³ sin que exista una diferencia significativa entre los grupos de muestras analizados. Estos valores se encuentran en el rango descrito en la bibliografía para el hueso esponjoso, cuya densidad aparente se sitúa entre 0,14 y 1,2 g/cm³. 32

A través de los datos de densidad aparente y de densidad del material macizo, es posible determinar la porosidad de las piezas impresas (Tabla 14). Para una concentración del 2% no existe un aumento significativo de este parámetro con respecto a las piezas de policaprolactona pura. No obstante, cuando se incrementa la cantidad de MCC al 5% y 10 %, sí existe un incremento del 5,5% en el primer caso y un 4,3% en el segundo. Este ligero incremento de la porosidad puede tener su justificación en un aumento de los microporos presentes en los filamentos al no existir una buena dispersión del aditivo en la matriz. Esta explicación se fundamenta no solo en los datos de porosidad, sino también en las imágenes de microCT (Figura 16) y microscopía electrónica (Figura 12) presentadas en apartados previos.

Por otra parte, la distancia entre filamentos puede evaluarse como el tamaño de poro, debido a que el patrón de impresión utilizado es rectilíneo con un ángulo  $0/90^{\circ}$  entre capas. De esta forma, las estructuras analizadas presentan unos poros de entre 450-500 µm (Tabla 14). El tamaño de poro adecuado para las estructuras susceptibles de ser empleadas en regeneración de hueso está comprendido entre 150-500 µm.  $^{33,34}$  Por consiguiente, todas las estructuras de composite propuestas en este estudio satisfacen este requerimiento, ya que los tamaños de poro medidos se sitúan entre los 448 y los 482 µm.



Material	Densidad aparente (g/cm³)	Porosidad (%)	Distancia entre filamentos (µm)
PCL	0,52±0,03	52,3±2,5	463±26
PCL:MCC 98:2	0,53±0,02	54,2±1,4	470±36
PCL:MCC 95:5	0,48±0,03	57,8±2,8**	482±31*
PCL:MCC 90:10	0,49±0,03	56,6±2,3*	448±54

Tabla 14. Datos de porsosidad de piezas impresas de policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina (\* p<0,05; \*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001 tomando como referencia el conjunto de datos de la PCL pura).

### 4.5.2. ENSAYOS MECÁNICOS

A continuación se presentan los valores de módulo de elasticidad y límite elástico obtenidos en los ensayos a compresión y flexión en tres puntos para las piezas composites en base policaprolactona: celulosa microcristalina, así como los valores correspondientes a las piezas sin aditivar.

## 4.5.2.1. ENSAYOS DE COMPRESIÓN

En la Tabla 15 se presentan los valores de los parámetros mecánicos a compresión. Los valores del módulo de elasticidad se encuentran en el rango de otras estructuras impresas de base policaprolactona propuestas para su utilización como *scaffolds* en ingeniería de tejidos<sup>35,36</sup> y en el intervalo referenciado para el hueso trabecular, que se sitúa entre los 20 y los 500 MPa. No obstante, los valores son lejanos al intervalo referenciado para el hueso cortical, que se sitúa entre 3-30 GPa. Por tanto, es posible concluir que las estructuras propuestas en este trabajo tienen un ámbito de potencial aplicación en la regeneración de hueso trabecular.

Con respecto a la influencia de la presencia del aditivo sobre las propiedades mecánicas de los scaffolds evaluados, cabe destacar que el valor del módulo de compresión se incrementa para el grupo de estructuras que contiene un 2% p/p de celulosa microcristalina frente a las que no contienen aditivo (32,0 MPa frente a 25,2 MPa). El valor de este parámetro disminuye hasta los 29 MPa cuando la concentración de aditivo sube hasta un 5%, si bien continúa siendo superior al citado valor para las estructuras fabricadas en policaprolactona pura. Si bien estas diferencias no son significativas desde un punto de vista estadístico, sí muestran una tendencia al incremento de la rigidez de las estructuras que puede justificarse por la mayor cristalinidad de la matriz, confirmada por: los ensayos calorimétricos, el análisis de espectroscopía infrarroja y los datos de densidad de los materiales composites. Por su parte, existe un descenso significativo del módulo de compresión cuando se alcanza un 10% de concentración de aditivo. Este descenso en las propiedades mecánicas de la estructura se justifica por una menor adhesión entre capas como consecuencia de los huecos en los filamentos observados mediante microscopía y microCT (Figura 12 y Figura 16). Por otra parte, cabe destacar que, a pesar de que se trata de un ensayo en una carga diferente, los datos del ensayo de tracción sobre láminas material (Tabla 12) no proporcionan este cambio de tendencia del incremento de la rigidez cuando el



material es analizado en forma de probetas macizas. Por consiguiente, parece más plausible que la justificación del descenso en el módulo de compresión se encuentre en los defectos de la estructura tridimensional que en el efecto de la presencia de las partículas de aditivo sobre las propiedades de la matriz.

Por otra parte, la tensión en el límite elástico es un 28% superior con un 2% de celulosa microcristalina que en el grupo de muestras sin aditivo (Tabla 15), lo que supone un incremento significativo en el valor de este parámetro. Existe también un ligero incremento para el grupo de muestras que contienen un 5% de esta sustancia, si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa (p>0,05). Por último y de forma análoga a la tendencia observada para el módulo de compresión, este parámetro disminuye de forma significativa cuando el contenido de aditivo se incrementa al 10%.

Material	Módulo de elasticidad a compresión (MPa)	Límite elástico (MPa)
PCL	25,2 ± 3,3	2,1 ± 0,2
PCL:MCC 98:2	32,0 ± 3,3	2,7 ± 0,3*
PCL:MCC 95:5	29,1 ± 4,7	2,5 ± 0,2
PCL:MCC 90:10	7,2 ± 1,7*	1,3 ± 0,1*

Tabla 15. Parámetros mecánicos a compresión para las combinaciones de policaprolactona-celulosa microcristalina evaluadas.

En este punto, cabe definir que en este trabajo el concepto de refuerzo se establece como el aumento del módulo elástico y el límite elástico de forma simultánea, tal como establece Rothon.<sup>38</sup> Por tanto, es posible concluir que la celulosa microcristalina ejerce un efecto de refuerzo sobre la policaprolactona en estructuras obtenidas mediante fabricación aditiva por extrusión térmica para las concentraciones de aditivo del 2% y el 5% p/p.

## 4.5.2.2. ENSAYOS DE FLEXIÓN EN TRES PUNTOS

En la siguiente tabla (Tabla 16) se muestran los valores del módulo de elasticidad y límite elástico a flexión calculados de acuerdo con el procedimiento indicado en el Capítulo 3. Como puede comprobarse, la introducción de la celulosa microcristalina ejerce un efecto de incremento de la rigidez para la matriz en las concentraciones de un 2% y un 5% de este aditivo.

Así, se observa un incremento significativo (p<0,05) del módulo de elasticidad, siendo los incrementos de un 19 y 25% respectivamente. Para las muestras con un 10% de celulosa no existe una diferencia significativa en el módulo de elasticidad (p>0,05).



Material	Material Módulo de elasticidad a flexión (MPa)	
PCL	60,9±2,9	7,2±0,4
PCL:MCC 98:2	72,4±5,2 *	7,1±0,5
PCL:MCC 95:5	76,2±11,5 *	6,9±0,8
PCL:MCC 90:10	55,2±4,6	4,0±0,3

Tabla 16. Parámetros mecánicos a flexión para las combinaciones de policaprolactona-celulosa microcristalina evaluadas (\* p<0,05).

Por su parte, la presencia de aditivo no afecta al valor del límite de elasticidad para las concentraciones del 2 y 5%. Sin embargo, para las muestras que contienen un 10% de celulosa microcristalina, se observa una disminución significativa de este parámetro.

Por tanto, el análisis de los datos de la caracterización de las piezas a flexión arroja conclusiones similares a las realizadas para el caso del ensayo a compresión: existe un incremento de la rigidez de las estructuras cuando la concentración de aditivo se sitúa en valores bajos (2 y 5% p/p), ya que cuando la concentración del aditivo se sitúa en un 10% p/p el proceso de deposición es deficiente y la estructura obtenida tiene defectos morfológicos que debilitan la adhesión entre capas y, por tanto, la estabilidad de la estructura.

La importancia de la procesabilidad en las propiedades mecánicas de los scaffolds obtenidos en este estudio se evidencia al comparar los datos de los ensayos mecánicos realizados sobre probetas obtenidas mediante moldeo por compresión y sobre probetas obtenidas por fabricación aditiva. Así, el incremento del módulo de elasticidad también se observó en el ensayo a tracción realizado con probetas obtenidas mediante moldeo por compresión (Tabla 12). En aquel caso, el valor del módulo pasaba de un valor de 224,2±14,4 MPa en el caso de la PCL a 388,3±30,5 para la PCL:MCC 80:20, siendo el incremento continuo conforme se incrementaba la cantidad de celulosa microcristalina introducida en la formulación. Sin embargo, en el caso de las probetas obtenidas mediante fabricación aditiva, el valor máximo del módulo a compresión se observa en el grupo de muestras PCL:MCC 98:2 con un módulo de 32,0±3,3 MPa y en el grupo PCL:MCC 95:5 para el ensayo a flexión, con un valor del módulo de 76,2±11,5 MPa.

Otros autores ya han descrito la presencia de un valor máximo de concentración para que se dé el efecto de refuerzo al añadir aditivos no termoplásticos en una matriz de policaprolactona. Un ejemplo es el estudio realizado por Ródenas y colaboradores, quienes utilizan vidrio bioactivo e hidroxiapatita como materiales de refuerzo. En ese caso, la hidroxiapatita deja de tener papel de refuerzo cuando se encuentra en una proporción del 20% y el biovidrio, para un 10%<sup>25</sup>. Unas conclusiones similares obtuvieron Torres y colaboradores<sup>39</sup> al utilizar la hidroxiapatita y los nanotubos de haloisita simultáneamente como aditivos, cuyo refuerzo máximo se sitúa en el 20% y el 7,5% respectivamente.

No obstante, estos autores<sup>39</sup> citan la importancia de la dispersión de las partículas de aditivo en la matriz para mejorar el efecto de refuerzo observado. Así, proponen la mejora de su material composite mediante el empleo de la modificación



química de la superficie de los nanotubos<sup>40</sup> o el empleo de sucesivas etapas de extrusión<sup>41</sup> como forma de distribuir el material. Estas estrategias podrían también ser empleadas para disminuir la tendencia a la formación de aglomerados de la celulosa microcristalina en el seno de la matriz de policaprolactona (descrita en el apartado 4.5.1.), mejorando de esta manera el efecto de refuerzo observado.

Otra alternativa de mejora podría ser el empleo de un recubrimiento de hidroxiapatita mediante la inmersión de las estructuras en fluido corporal simulado, estrategia que ya ha sido valorada en el Estado del Arte como método de refuerzo de estructuras de ácido poliláctico y policaprolactona. Esta estrategia, al tratarse de un método superficial, puede ser combinada con las anteriormente mencionadas para incrementar en mayor medida la rigidez de la estructura, haciéndola adecuada para un mayor número de aplicaciones de regeneración ósea.

# 4.5.3. ESTUDIO DE LA HIDROFILICIDAD MEDIANTE EL ANÁLISIS DE LA ABSORCIÓN DE PBS

En la Figura 17 se muestran los datos de hinchado en PBS obtenidos para las piezas impresas de policaprolactona y sus composites por adición de celulosa microcristalina. Si se comparan estos valores con los correspondientes al ensayo equivalente con láminas macizas obtenidas mediante moldeo por compresión (Figura 4 y Figura 5), es posible comprobar que en aquel caso la cantidad de PBS que las muestras son capaces de retener se incrementa conforme lo hace su concentración de aditivo, mientras que en este caso existe un máximo de absorción para las piezas que contienen un 5% p/p de aditivo. Es posible que esta tendencia se justifique por la presencia de microporos en la superficie de los filamentos (Figura 12), de tal forma que en las piezas que contienen un 10% p/p de celulosa microcristalina el líquido no sea capaz de penetrar fácilmente en estos microporos, creándose pequeñas burbujas de aire sobre la pieza que disminuyen la capacidad de la misma de absorber PBS.

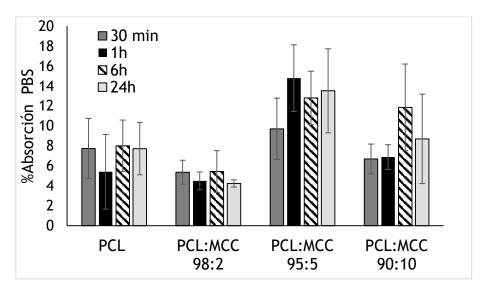


Figura 17. Porcentaje de absorción de PBS para policaprolactona y sus composites con celulosa microcristalina.



# 4.5.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS

Las muestras utilizadas para los ensayos biológicos fueron discos de 8 mm de diámetro y un espesor de 3 mm troquelados a partir de placas rectangulares impresas con un patrón análogo al descrito para el resto de ensayos. Estas muestras fueron esterilizadas mediante inmersión en etanol al 70% durante 30 minutos en campana de flujo laminar. Transcurrido este tiempo, se eliminó el etanol y se lavaron las muestras tres veces con PBS y tres veces con medio (DMEM).

Estos ensayos se realizaron con las mismas células mesenquimales de oveja anteriormente especificadas para los ensayos de viabilidad sobre láminas obtenidas mediante moldeo por compresión, cultivadas igualmente en medio DMEM bajo en glucosa suplementado con 1% de penicilina-estreptomicina y 10% en suero fetal de ternera.

Para asegurar que las células colonizaran el interior de las estructuras tridimensionales, se realizó una siembra dinámica, que consistió en introducir 1 ml de medio que contiene 150000 células en un tubo de ensayo donde previamente se ha ubicado una muestra impresa circular de 8 mm de diámetro. Posteriormente, los tubos se agitaron durante una hora en la incubadora a 37°C y con un 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 18). Posteriormente, las muestras se transfirieron a una placa multipocillo con fondo sin tratar en la que el medio se cambió cada dos días. El cultivo se llevó a cabo con muestras duplicadas de cada uno de los tipos de material composite evaluados (PCL, PCL:MCC 98:2, PCL:MCC 95:5 y PCL:MCC 90:10).



Figura 18. Procedimiento de siembra dinámica.

La viabilidad de las células cultivadas sobre muestras tridimensionales se evaluó siguiendo el mismo procedimiento que el ya indicado para las muestras obtenidas en moldeo por compresión (protocolo Presto Blue). Los días de cultivo analizados fueron 1, 3 y 8.

En la Figura 19 se presentan los resultados del ensayo de viabilidad celular descrito. En primer lugar, cabe destacar que se confirma la biocompatibilidad de todas las combinaciones de materiales analizadas en términos de viabilidad celular, ya que en todos los grupos de muestras existe un incremento de la señal de fluorescencia (relacionada con un crecimiento de la población de células) entre los días 1 y 8. Como puede comprobarse, no existe una diferencia significativa en el proceso de anclaje celular, ya que en el día 1 todos los grupos de muestras presentan valores similares de fluorescencia. Para el día 3 es posible observar un ligero descenso en las muestras de PCL, PCL:MCC 95:5 y PCL:MCC 90:10. De manera similar al efecto descrito para las muestras obtenidas mediante moldeo por compresión, es posible que este ligero



descenso se deba a la muerte de una parte de la población celular que fue capaz de anclarse parcialmente a las muestras, pero no lo suficiente como para sobrevivir entre los días 1 y 3. La excepción a esta tendencia son las muestras que contienen un 2% de celulosa microcristalina. Además, este grupo de muestras presenta un incremento significativo de la señal de fluorescencia para el día 8, lo que supone la confirmación de que la introducción de este aditivo mejora la proliferación celular de manera notable para esta concentración. No obstante, para el conjunto de piezas que contienen un 10% de celulosa microcristalina, la tendencia es contraria y la señal de fluorescencia es significativamente menor a la obtenida con las muestras de policaprolactona. Otros autores han descrito una dependencia similar de la mejora de la proliferación celular con la concentración de material particulado en composites para aplicaciones de regeneración ósea, tal como se señaló en el análisis de los resultados de la evaluación de la viabilidad celular en los cultivos realizados sobre muestras fabricadas por moldeo por compresión (presentados en el apartado 4.3.8. de este capítulo).<sup>24,25</sup>

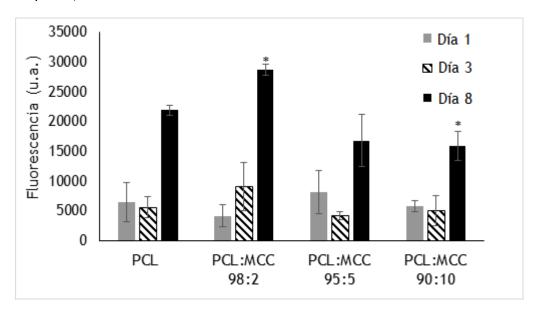


Figura 19. Resultados del ensayo de viabilidad celular para las muestras impresas de policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina (\* p< 0,05 con respecto a la policaprolactona pura).

De hecho, si se comparan estos dos conjuntos de datos (piezas obtenidas por moldeo por compresión y piezas porosas obtenidas por fabricación aditiva, Figura 11 y Figura 19, respectivamente), es posible comprobar ciertas similitudes. En primer lugar, en ambos casos la introducción del aditivo mejora la proliferación celular para bajas concentraciones de celulosa microcristalina, pero empeora los resultados cuando se incrementa la concentración. Sin embargo, el valor máximo de fluorescencia se presenta en el 5% p/p de concentración en el caso de las piezas obtenidas en moldeo por compresión y en el 2% p/p para las piezas tridimensionales. Por tanto, es posible confirmar que el método de fabricación influye sobre la capacidad de mejora en la afinidad celular que es capaz de proporcionar el aditivo con respecto al material base.

Esta disminución de la proliferación celular puede deberse a que las diferencias en la topografía superficial señaladas en apartados anteriores jueguen un papel contraproducente en los procesos biológicos necesarios para la proliferación de las



células. Debido a los cambios que se observan en la morfología de los filamentos (Figura 12) es posible que la microtopografía de los mismos afecte al mecanismo de colonización de la estructura. Naganuma<sup>43</sup> analizó cómo la microtopografía puede afectar al comportamiento de células adherentes sobre superficies de ácido poliláctico. Esta autora concluyó que la forma de los micropatrones existentes en la superficie puede direccionar el anclaje de los filopodios y, por consiguiente, influenciar la orientación de las células y su proliferación. En el caso que nos ocupa, la microtopografía de los filamentos tiene un patrón irregular y es posible que ello dificulte los procesos de proliferación, tal como sugieren los resultados del ensayo de viabilidad celular.

En cualquier caso, debido a la complejidad de los procesos biológicos de anclaje y proliferación, la propuesta de un mecanismo más detallado del proceso que provoca que la celulosa tenga un efecto positivo sobre los valores de viabilidad que se presentan en este estudio precisaría de una evaluación más exhaustiva, que puede ser parte de una continuación al trabajo que se presenta en esta tesis doctoral.

Tras los ocho días de cultivo, las muestras se sometieron además al protocolo de tinción células vivas/células muertas. Con el fin de evaluar si los reactivos utilizados durante la tinción son adsorbidos por la celulosa microcristalina, se realizó un blanco sobre las muestras utilizadas como control negativo durante el ensayo de viabilidad. Por tanto, estas estructuras composites han sido inmersas en el medio empleado para el cultivo, así como sometidas a la incubación con el reactivo Presto Blue<sup>®</sup>. Tal como puede comprobarse en la Figura 20, ambos reactivos de tinción (rojo y verde) tienen cierta afinidad por las partículas de celulosa, por lo que la observación de las imágenes obtenidas mediante esta técnica tienen una validez limitada, si bien pueden emplearse para identificar cómo se distribuyen las células sobre la superficie del scaffold, ya que los agregados de células pueden distinguirse por su morfología (Figura 21).

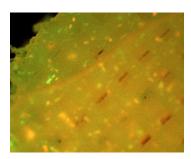


Figura 20. Estructura impresa PCL:MCC 98:2 sometida al proceso de tinción sin células sobre la superficie de la muestra.

De esta forma, en las imágenes obtenidas tras la tinción, es posible observar que en la muestra que contiene un 10% de celulosa microcristalina existen agregados de células (Figura 21).



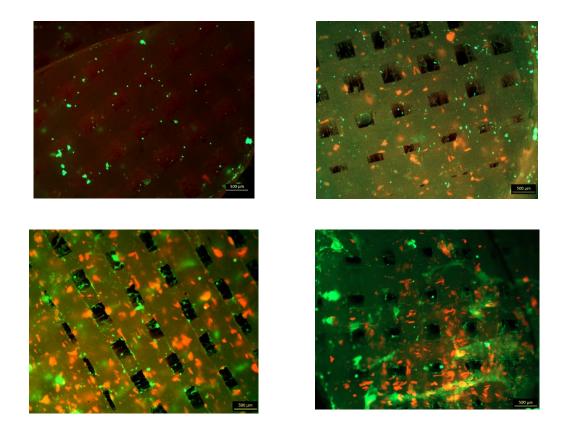


Figura 21. Fotografías tras marcaje células vivas/muertas PCL, PCL:MCC 98:2, PCL:MCC 95:5 y PCL:MCC 90:10 (de izquierda a derecha y en sentido descendente). Escala: 500 μm.

Por último, se realizó un protocolo de fijación y secado a muestras que habían sido cultivadas durante 8 días para la observación de la morfología celular mediante microscopía electrónica. Para ello, se extrajo el medio y se sumergieron las muestras en formalina durante 5 minutos, repitiéndose este lavado por duplicado. Posteriormente, se lavaron las muestras dos veces con PBS antes de proceder a su deshidratación con sucesivos lavados con disoluciones acuosas de etanol de las siguientes concentraciones (v/v): 20%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90% y 96%. Las muestras fueron sumergidas en estas disoluciones dos veces durante 5 minutos cada vez y a continuación fueron inmersas dos veces en etanol al 100% durante 10 minutos. Finalmente. realizaron tres lavados disolución 1:1 se con una de etanol:hexametildisilazano y se repitió el proceso con hexametildisilazano puro. El volumen de líquido utilizado en el último lavado se dejó en el pocillo durante 24 horas para permitir su evaporación. Tras la finalización de este protocolo de fijación y secado, las muestras se metalizaron con Pt/Au durante 5 minutos a un voltaje de 12V y una intensidad de corriente 35 mA. La observación de las muestras se llevó a cabo en un microscopio Jeol JM5500 a una aceleración de voltaje de 10 kV.

En las fotografías obtenidas (Figura 22), es posible observar que las células son capaces de formar agregados sobre las muestras que contienen un 5 y un 10% de celulosa microcristalina, mientras que en las muestras que no contienen este aditivo las células proliferan de forma mucho más aislada.



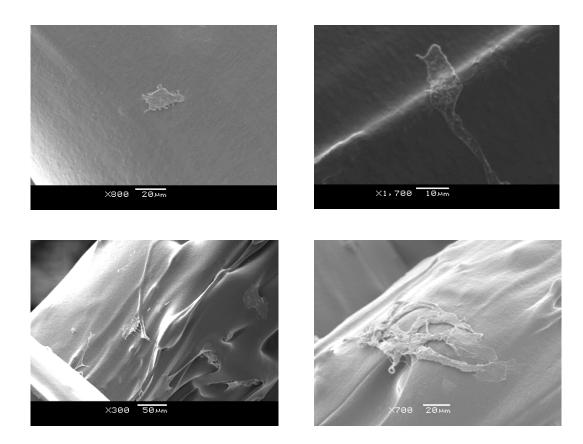


Figura 22. Fotografías al microscopio electrónico de las células cultivas en PCL, PCL:MCC 98:2, PCL:MCC 95:5 y PCL:MCC 90:10 (de izquierda a derecha y en orden descendente).

Los procesos de diferenciación celular vienen favorecidos por estructuras o materiales que favorezcan la interacción entre células. A modo de ejemplo, Huri y colaboradores realizaron un análisis sobre la influencia del tamaño de poro sobre la capacidad de diferenciación de células adiposas pluripotenciales. <sup>44</sup> Estos autores concluyeron que de entre los tamaños de poro evaluados, los de mayores dimensiones eran los más apropiados debido a que permitían una mayor interacción entre las células.

De acuerdo con estos antecedentes, el hecho de que las células sean capaces de establecer agregados en las estructuras que contienen celulosa microcristalina supondría un factor coadyuvante de sus procesos de diferenciación. Sin embargo, en este trabajo no se incluye un estudio de este tipo de procesos para poder confirmar esta hipótesis, si bien puede proponerse la realización de este tipo de análisis como complemento a los resultados que se presentan en este capítulo. Esta propuesta se justifica no solo en base a la observación de los mencionados agregados celulares, sino también por el incremento de la rigidez del material soporte que se observa como consecuencia de la introducción de la celulosa microcristalina. Autores como Bracaglia y colaboradores<sup>22</sup> o Engler y colaboradores<sup>23</sup> han analizado cómo influye la rigidez de la matriz sobre los procesos de diferenciación y migración de células pluripotenciales, de tal forma que es posible que el refuerzo descrito en los materiales composites de este trabajo tenga también un efecto en términos biofuncionales.



## 4.6. CONCLUSIONES

La introducción de la celulosa microcristalina en la matriz de policaprolactona puede emplearse como estrategia para la obtención de un material composite con unas características de fluidez que permiten la obtención de piezas mediante fabricación aditiva con una porosidad muy similar a las obtenidas con policaprolactona.

Estas piezas tienen un módulo de compresión y flexión superiores a las fabricadas en material sin aditivar siempre y cuando la concentración en peso del aditivo sea baja. El incremento de la rigidez en los composites propuestos se debe a que las partículas de aditivo son capaces de actuar como puntos de nucleación durante el proceso de cristalización, de tal forma que la matriz tiene una mayor cristalinidad que la policaprolactona pura, tal como demuestran los datos del análisis térmico, del espectro FTIR, de la difracción de rayos X y de la densidad de las muestras evaluadas. Además, los valores del módulo de compresión determinados son válidos para el empleo de estas estructuras en la regeneración de hueso trabecular. Por tanto, esta podría ser una de las potenciales aplicaciones de las estructuras PCL:MCC en el campo de la Ingeniería de Tejidos.

En este estudio, el efecto de refuerzo se observó para un 2% y un 5% p/p. Sin embargo, para un 10% p/p de concentración las propiedades mecánicas descienden de forma significativa. Tal como se ha explicado a lo largo del capítulo, la disminución de las propiedades mecánicas en las piezas porosas obtenidas mediante fabricación aditiva se debe a un empeoramiento de la estructura interna debido a que el proceso de impresión se ve limitado por la excesiva cantidad de material particulado existente. En este punto, se propone como línea futura la búsqueda de estrategias que eviten la formación de aglomerados de partículas de celulosa microcristalina en la matriz como forma de poder incrementar la cantidad de aditivo que es posible introducir manteniendo el efecto de refuerzo. Entre estas estrategias puede mencionarse la posibilidad de emplear un equipo de doble husillo para la obtención de los pellets con una distribución del aditivo más homogénea a partir de los cuales generar el filamento que alimenta a la impresora tridimensional o la búsqueda de métodos de funcionalización de la celulosa que permita mejorar la dispersión de este aditivo en la matriz de policaprolactona.

A nivel de afinidad biológica, tanto los ensayos de viabilidad celular realizados como la observación de las muestras mediante microscopía demuestran un efecto positivo de la introducción de la celulosa microcristalina sobre la proliferación celular. Sin embargo, es recomendable la realización de un estudio más profundo que permita identificar el mecanismo que justifica esta mejora de la afinidad celular del material composite.



# 4.7. BIBLIOGRAFÍA

- 1. Güldaş A, Güllü A, Çankaya A. Determination of the Rheological Properties of Polypropylene Filled with Colemanite. Polymers for Advanced Technologies 2017;28(9):1179-1184.
- 2. Koszkul J, Nabialek J. Viscosity models in simulation of the filling stage of the injection molding process. Journal of Materials Processing Technology 2004;157-158(SPEC. ISS.):183-187.
- 3. Hejna A, Formela K, Saeb MR. Processing, mechanical and thermal behavior assessments of polycaprolactone/agricultural wastes biocomposites. Industrial Crops and Products 2015;76:725-733.
- 4. Ruseckaite RA, Jiménez A. Thermal degradation of mixtures of polycaprolactone with cellulose derivatives. Polymer Degradation and Stability 2003;81(2):353-358.
- 5. Bajsić EG, Bulatović VO, Slouf M, Šitum A. Characterization of Biodegradable Polycaprolactone Containing Titanium Dioxide Micro and Nanoparticles. International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering 2014;8(7).
- 6. Liu X, Hasan MS, Grant DM, Harper LT, Parsons AJ, Palmer G, Rudd CD, Ahmed I. Mechanical, degradation and cytocompatibility properties of magnesium coated phosphate glass fibre reinforced polycaprolactone composites. Journal of Biomaterials Applications 2014;29(5):675-687.
- 7. Contreras H, Trujillo H, Arias G, Pérez J, Delgado E. Espectroscopia ATR-FTIR de celulosa: aspecto instrumental y tratamiento matemático de espectros. Revista Digital científica y tecnológica 2010:1-13.
- 8. Díez-Pascual AM, Díez-Vicente AL. Electrospun fibers of chitosan-grafted polycaprolactone/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) blends. Journal of Materials Chemistry B 2016;4(4):600-612.
- 9. Elzein T, Nasser-Eddine M, Delaite C, Bistac S, Dumas P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. Journal of Colloid and Interface Science 2004;273(2):381-387.
- 10. Senedese ALC, Filho ALL, Lopes da Silva JV, Neto PI, Sena Pereira F, Filho RM. Additive manufacturing to build polycaprolactone scaffolds. 2011; Brazil.
- 11. Honma T, Senda T, Inoue Y. Thermal properties and crystallization behaviour of blends of poly( $\epsilon$ -caprolactone) with chitin and chitosan. Polymer International 2003;52(12):1839-1846.
- 12. Murphy SH, Leeke GA, Jenkins MJ. A Comparison of the use of FTIR spectroscopy with DSC in the characterisation of melting and crystallisation in polycaprolactone. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 2012;107(2):669-674.
- 13. Phillipson K. Ageing and crystallisation of polycaprolactone. United Kingdom: University of Birmingham; 2014.
- 14. Mirhosseini MM, Haddadi-Asl V, Zargarian SS. Fabrication and characterization of hydrophilic poly(ε-caprolactone)/pluronic P123 electrospun fibers. Journal of Applied Polymer Science 2016;133(17).



- 15. Martins-Franchetti SM, Egerton TA, White JR. Morphological changes in poly(caprolactone)/poly(vinyl chloride) blends caused by biodegradation. Journal of Polymers and the Environment 2010;18(1):79-83.
- 16. Raucci MG, D'Antò V, Guarino V, Sardella E, Zeppetelli S, Favia P, Ambrosio L. Biomineralized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration. Acta Biomaterialia 2010;6(10):4090-4099.
- Lin HM, Lin YH, Hsu FY. Preparation and characterization of mesoporous 17. bioactive glass/ polycaprolactone nanofibrous matrix for bone tissues engineering. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2012;23(11):2619-2630.
- 18. Siqueira G, Bras J, Dufresne A. Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. Polymers 2010;2(4):728-765.
- Mucha M, Tylman M, Mucha J. Crystallization kinetics of polycaprolactone in 19. nanocomposites. Polimery/Polymers 2015;60(11-12):686-692.
- 20. Bazhenov S. Mechanical Behavior of Filled Thermoplastic Polymers. In: Cuppoletti J, editor. Metal, Ceramic and Polymeric Composites for Various Uses: InTech; 2011.
- Ji L, Wang W, Jin D, Zhou S, Song X. In vitro bioactivity and mechanical 21. properties of bioactive glass nanoparticles/polycaprolactone composites. Materials Science and Engineering: C 2015;46:1-9.
- 22. Bracaglia LG, Smith BT, Watson E, Arumugasaamy N, Mikos AG, Fisher JP. 3D printing for the design and fabrication of polymer-based gradient scaffolds. Acta Biomaterialia 2017;56:3-13.
- 23. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. Cell 2006;126(4):677-689.
- 24. Verrier S, Blaker JJ, Maquet V, Hench LL, Boccaccini AR. PDLLA/Bioglass® composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an in vitro cell biology assessment. Biomaterials 2004;25(15):3013-3021.
- 25. Ródenas-Rochina J, Ribelles JLG, Lebourg M. Comparative study of PCL-HAp and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2013;24(5):1293-1308.
- 26. Chen S, Guo Y, Liu R, Wu S, Fang J, Huang B, Li Z, Chen Z. Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2018;164:58-69.
- 27. Nikkhah M, Edalat F, Manoucheri S, Khademhosseini A. Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface. **Biomaterials** 2012;33(21):5230-5246.
- Yao X, Peng R, Ding J. Cell-material interactions revealed via material 28. techniques of surface patterning. Advanced Materials 2013;25(37):5257-5286.
- 29. Aldrich S. Cellulose-microcrystalline, powder Datasheet.
- 30. Caraschi JC, Lopes Leao A. Woodflour as reinforcement of polypropylene. Materials Research 2002;5(4).
- Nishikida K, Coates J. Infrared and Raman Analysis of Polymers. In: Lobo H, 31. Bonilla JV, editors. Handbook of plastics analysis; 2003.
- Fayyazbakhsh F, Solati-Hashjin M, Keshtkar A, Shokrgozar MA, Dehghan MM, 32. Larijani B. Novel layered double hydroxides-hydroxyapatite/gelatin bone tissue



- engineering scaffolds: Fabrication, characterization, and in vivo study. Materials Science and Engineering: C 2017;76:701-714.
- 33. Chuenjitkuntaworn B, Inrung W, Damrongsri D, Mekaapiruk K, Supaphol P, Pavasant P. Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2010;94(1):241-251.
- 34. Gómez-Lizárraga KK, Flores-Morales C, Del Prado-Audelo ML, Álvarez-Pérez MA, Piña-Barba MC, Escobedo C. Polycaprolactone- and polycaprolactone/ceramic-based 3D-bioplotted porous scaffolds for bone regeneration: A comparative study. Materials Science and Engineering: C 2017;79(Supplement C):326-335.
- 35. Olubamiji AD, Izadifar Z, Si JL, Cooper DML, Eames BF, Chen DXB. Modulating mechanical behaviour of 3D-printed cartilage-mimetic PCL scaffolds: Influence of molecular weight and pore geometry. Biofabrication 2016;8(2).
- 36. Domingos M, Intranuovo F, Gloria A, Gristina R, Ambrosio L, Bártolo PJ, Favia P. Improved osteoblast cell affinity on plasma-modified 3-D extruded PCL scaffolds. Acta Biomaterialia 2013;9(4):5997-6005.
- 37. Leong KF, Chua CK, Sudarmadji N, Yeong WY. Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 2008;1(2):140-152.
- 38. Rothon RN. Particulate-filled polymer composites: Rapra Technology Limited; 2003.
- 39. Torres E, Fombuena V, Vallés-Lluch A, Ellingham T. Improvement of mechanical and biological properties of Polycaprolactone loaded with Hydroxyapatite and Halloysite nanotubes. Materials Science and Engineering: C 2017;75:418-424.
- 40. Handge UA, Hedicke-Höchstötter K, Altstädt V. Composites of polyamide 6 and silicate nanotubes of the mineral halloysite: Influence of molecular weight on thermal, mechanical and rheological properties. Polymer 2010;51(12):2690-2699.
- 41. Fernández Á, Muniesa M, González J. Characterisation and processing of reinforced PA 6 with Halloysite nanotubes (HNT) for injection molding. Journal of Mechanical Engineering 2012;59(3):183-192.
- 42. Charles LF, Shaw MT, Olson JR, Wei M. Fabrication and mechanical properties of PLLA/PCL/HA composites via a biomimetic, dip coating, and hot compression procedure. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2010;21(6):1845-1854.
- 43. Naganuma T. The relationship between cell adhesion force activation on nano/micro-topographical surfaces and temporal dependence of cell morphology. Nanoscale 2017;9(35):13171-13186.
- 44. Huri PY, Ozilgen BA, Hutton DL, Grayson WL. Scaffold pore size modulates in vitro osteogenesis of human adipose-derived stem/stromal cells. Biomedical Materials (Bristol) 2014;9(4).



## 4.8. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las unidades monoméricas de la celulosa microcristalina 106
Figura 2. Isotermas de PCL, PCL:MCC 98:2, PCL:MCC 95:5 y PCL:MCC 90:10 a una temperatura de 210°C
Figura 3. Correlación de pérdida de peso a 150°C (evaluada mediante TGA) y la cantidad de celulosa microcristalina introducida en la matriz de policaprolactona. 115
Figura 4. Absorción de agua para la policaprolactona y sus composites para 1h, 2h, 24h y 48h de inmersión (*p<0,05 comparado con el grupo equivalente de muestras de policaprolactona)
Figura 5. Absorción de PBS para la policaprolactona y sus composites para 1h, 2h, 24h y 48h de inmersión (*p<0,05 comparado con el grupo equivalente de muestras de policaprolactona)
Figura 6. Fotografías al microscopio óptico de la distribución de partículas de celulosa microcristalina (PCL, PCL:MCC 98:2, PCL:MCC 95:5; PCL:MCC 90:10). Escala: 1 mm
Figura 7. Espectro infrarrojo de policaprolactona y celulosa microcristalina 119
Figura 8. Espectro infrarrojo de las combinaciones de policaprolactona y celulosa microcristalina
Figura 9. Patrones de difracción de rayos X de la policaprolactona y sus composites con celulosa microcristalina
Figura 10. Correlación entre módulo de elasticidad a tracción y concentración de celulosa microcristalina para probetas obtenidas mediante moldeo por compresión.
Figura 11. Resultados del ensayo de viabilidad celular para las muestras obtenidas por moldeo por compresión de policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina (* p< 0,05, **p<0,01 tomando como referencia la policaprolactona pura).
Figura 12. Imágenes al microscopio electrónico PCL, PCL:MCC 98:2 y PCL:MCC 95:5, respectivamente. (Barra de escala: 1 mm)
Figura 13. Medición de los huecos de los filamentos en piezas que contienen un 10% de MCC (Escala: 1 mm)
Figura 14. Fotografía pieza impresa de PCL (Escala: 1 mm)
Figura 15. Fotografía pieza impresa de PCL:MCC 98:2 (Escala: 1 mm)
Figura 16. Secciones transversales de piezas impresas (de izquierda a derecha: PCL; PCL:MCC 98:2, PCL:MCC 95:5 y PCL:MCC 90:10)
Figura 17. Porcentaje de absorción de PBS para policaprolactona y sus composites con celulosa microcristalina
Figura 18. Procedimiento de siembra dinámica



Figura 19. Resultados del ensayo de viabilidad celular para las muestras impresas o policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina (* p< 0,05 con respecto a la policaprolactona pura)
Figura 20. Estructura impresa PCL:MCC 98:2 sometida al proceso de tinción sin célul sobre la superficie de la muestra.
Figura 21. Fotografías tras marcaje células vivas/muertas PCL, PCL:MCC 98:2, PCL:MC 95:5 y PCL:MCC 90:10 (de izquierda a derecha y en sentido descendente). Escala: 5 μm
Figura 22. Fotografías al microscopio electrónico de las células cultivas en PC PCL:MCC 98:2, PCL:MCC 95:5 y PCL:MCC 90:10 (de izquierda a derecha y en ordedescendente).



## 4.9. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores del factor de corrección de Rabinowitsch-Mooney para cada una de las combinaciones de materiales y temperaturas evaluadas
Tabla 2. Valores de velocidad de cizalla corregida y viscosidad para la isoterma de 190°C para el material PCL:MCC 95:5
Tabla 3. Valores de los parámetros de ajuste y regresión de las ecuaciones potenciales de las isotermas evaluadas para la policaprolactona y los composites basados en mezclas PCL:MCC
Tabla 4. Valores de los parámetros de ajuste de la policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina para el modelo exponencial 111
Tabla 5. Valores de los parámetros de ajuste de la policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina para el modelo de segundo orden 111
Tabla 6. Valores de los parámetros de ajuste de la policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina para el modelo de segundo orden (Continuación)
Tabla 7. Coeficientes de correlación de cada modelo para las diferentes combinaciones de policaprolactona-celulosa microcristalina evaluadas
Tabla 8. Valores de temperatura de máxima degradación, temperatura de fusión, entalpía de fusión y cristalinidad de la policaprolactona, la celulosa microcristalina y sus combinaciones
Tabla 9. Valores del ángulo de contacto en muestras secas y prehumedecidas 117
Tabla 10. Datos de relación de áreas de pico de CH2 y C-O-C (* p<0,05; ** p<0,01, tomando como referencia el conjunto de datos de la PCL pura)
Tabla 11. Área de los principales picos de difracción de rayos X
Tabla 12. Resultados ensayos de tracción láminas obtenidas por compresión de policaprolactona y composites policaprolactona: celulosa microcristalina (*p<0,05) 123
Tabla 13. Datos de densidad de la policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina (* p<0,05; ** p<0,01, ***p<0,001 tomando como referencia el conjunto de datos de la PCL pura)
Tabla 14. Datos de porsosidad de piezas impresas de policaprolactona y sus combinaciones con celulosa microcristalina (* p<0,05; ** p<0,01, ***p<0,001 tomando como referencia el conjunto de datos de la PCL pura)
Tabla 15. Parámetros mecánicos a compresión para las combinaciones de policaprolactona-celulosa microcristalina evaluadas
Tabla 16. Parámetros mecánicos a flexión para las combinaciones de policaprolactona- celulosa microcristalina evaluadas (* p<0,05)



Capítulo 5. Evaluación de la carboximetilcelulosa como aditivo.

## CONTENIDO

5.1. Int	roducción	• • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		149
5.2. Pro	piedades de flujo	• • • • • • • • •				150
5.3. policapi	Caracterización rolactona:carboximetil					
5.3.1	. Termogravimetría	• • • • • • • • • •				155
5.3.2	. Retención de tampór	fosfato	salino (PB	S) y agua		157
5.3.3	. Ángulo de contacto .	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •				159
5.3.4	. Análisis cualitativo d	e la distr	ibución de	partículas.		161
5.3.5	. Espectroscopía infrai	roja				162
5.3.6	. Ensayos de tracción .	• • • • • • • • •				164
5.3.7	. Cultivo celular y eva	uación d	le la prolif	eración celı	ılar	165
5.4. Fal	oricación de las estruc	turas tric	dimensiona	ıles		167
5.5. policapi	Caracterización rolactona:carboximetil					tridimensionales
	. Morfología de las est					
5.5	.1.1. Observación en r	nicroCT.				169
5.5	.1.2. Porosidad	• • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		170
5.5.2	. Ensayos mecánicos	• • • • • • • • • •				171
5.5	.2.1. Ensayos de comp	resión				171
5.5	.2.2. Ensayos de flexió	n en tre	s puntos			172
5.5.3	. Estudio de la hidrofil	icidad m	ediante el	análisis de	la absorc	ión de PBS 172
5.5.4. E	Insayos biológicos	• • • • • • • • •				173
5.6. Co	nclusiones	• • • • • • • • • •				176
5.7. Ref	ferencias	• • • • • • • • •			• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	178
5.8. Índ	ice de figuras	• • • • • • • • •				181
5.9 Índ	lice de tablas					187

#### 5.1. INTRODUCCIÓN

La carboximetilcelulosa (CMC) es un polímero seminatural biodegradable y biocompatible. A nivel estructural, se trata de un derivado de la celulosa en cuya cadena principal se han introducido grupos carboximetil (Figura 1).

Figura 1. Estructura química de la carboximetilcelulosa de sodio.

Tal como se describió en el Capítulo 2. Revisión del Estado del arte, esta sustancia es habitualmente empleada en sistemas de liberación controlada de fármacos y existen referencias bibliográficas acerca de su empleo en el campo de la Ingeniería de Tejidos. 1-3

No obstante, no se han encontrado precedentes de la combinación de esta sustancia con policaprolactona para su procesado mediante técnicas de fabricación aditiva basadas en extrusión térmica. Por ello, en este trabajo se ha analizado la procesabilidad de diferentes combinaciones de base policaprolactona en la que se añade carboximetilcelulosa como aditivo.

En este capítulo se incluyen los resultados de los ensayos de caracterización de las mezclas de policaprolactona (PCL) y carboximetilcelulosa (CMC), así como la discusión sobre los mismos.

En los primeros apartados se analizan los datos obtenidos para muestras de material en lámina (propiedades de flujo, termogravimetría, espectroscopía infrarroja, medición del ángulo de contacto, medición de la capacidad de retención de agua y tampón fosfato salino, ensayos mecánicos a tracción y evaluación biológica). Las conclusiones más relevantes de estos ensayos se encuentran publicados en el artículo Tunability of polycaprolactone hydrophilicity by carboxymethyl cellulose loading, Journal of Applied Polymer Science. A modo de resumen, es posible destacar que estos resultados han permitido verificar la posibilidad de modular la hidrofilicidad del material composite modificando la concentración de carboximetilcelulosa introducida en la formulación.

Por otra parte, en los apartados posteriores, se incluye una descripción de la procesabilidad de las mezclas policaprolactona:carboximetilcelulosa propuestas en este trabajo para ser procesadas mediante fabricación aditiva de manera análoga a la ya descrita en el capítulo anterior para el caso de las mezclas de policaprolactona:celulosa microcristalina. Es posible destacar que las pruebas realizadas evidencian que la concentración de CMC que es posible incorporar en los



materiales composites está limitada por la tendencia a la aglomeración de sus partículas. Por esta razón, la cantidad de formulaciones que han podido procesarse mediante fabricación aditiva y caracterizarse en términos de morfología, porosidad y propiedades mecánicas de las piezas tridimensionales es menor a las anteriormente presentadas para el caso de las mezclas de policaprolactona y celulosa microcristalina.

#### 5.2. PROPIEDADES DE FLUJO

Tal como se explicó en el capítulo anterior para el caso de la celulosa microcristalina, la primera fase de caracterización llevada a cabo fue el análisis de las propiedades de flujo de las mezclas de material. En este caso, debido a las dificultades de procesabilidad que se presentan para la mezcla que contiene un 10% p/p de aditivo, esta combinación no ha sido incluida en este estudio.

En la Tabla 1 se muestran los valores del factor de corrección de Rabinowitsch-Mooney para todos los materiales analizados.

Material	Temperatura (°C)	b	R <sup>2</sup>
PCL	170	0,2371	0,9304
PCL	190	0,2921	0,9845
PCL	210	0,3793	0,9940
PCL:CMC 98:2	170	0,2675	0,9930
PCL:CMC 98:2	190	0,2773	0,9702
PCL:CMC 98:2	210	0,3140	0,9801
PCL:CMC 95:5	170	0,2168	0,9772
PCL:CMC 95:5	190	0,2185	0,9842
PCL:CMC 95:5	200	0,2717	0,9710

Tabla 1. Valores del factor de corrección de Rabinowitsch-Mooney para cada una de las combinaciones de materiales con base policaprolactona-carboximetilcelulosa y temperaturas evaluadas.

Tal como se comentó en el Capítulo 4, valores del factor de Rabinowitsch-Mooney cercanos a la unidad son característicos de flujos que se acercan al modelo ideal de flujo newtoniano. Como puede comprobarse en la tabla anterior (Tabla 1), la introducción del aditivo disminuye los valores de este parámetro en los materiales composite con respecto a la policaprolactona pura. De esta manera, se comprueba que la introducción del aditivo provoca que el modelo de flujo se aleje del comportamiento ideal.

A partir de estos datos es posible calcular los valores de velocidad de cizalla corregida a través de la ecuación explicada en los capítulos precedentes:

$$\dot{\gamma}_{co} = \left(\frac{3b+1}{4b}\right) \cdot \dot{\gamma}_{ap}$$



Con estos valores, a su vez, ha sido posible determinar la viscosidad a diferentes velocidades de cizalla, obteniendo de esta forma las curvas de viscosidad isotermas.

En la Tabla 2 se muestran los parámetros de ajuste del modelo potencial para cada uno de los materiales analizados y las isotermas de 170°C, 190°C y 210°C.

$$\eta = a \cdot \dot{\gamma}_{co}^n$$

Material	Temperatura (°C)	a	n	R <sup>2</sup>
PCL	170	70186	-0,750	0,9983
PCL	190	45763	-0,708	0,9973
PCL	210	18163	-0,621	0,9977
PCL:CMC 98:2	170	61003	-0,732	0,9991
PCL:CMC 98:2	190	55441	-0,723	0,9955
PCL:CMC 98:2	210	37053	-0,686	0,9958
PCL:CMC 95:5	170	95313	-0,783	0,9982
PCL:CMC 95:5	190	83255	-0,778	0,9979
PCL:CMC 95:5	200	54796	-0,728	0,9959

Tabla 2. Valores de los parámetros de ajuste y regresión de las ecuaciones potenciales de las isotermas evaluadas para la policaprolactona y los composites basados en mezclas PCL:CMC.

Tal como ocurría en las mezclas policaprolactona: celulosa microcristalina (Capítulo 4), la presencia del aditivo implica un aumento del valor absoluto de ambos parámetros de ajuste (a y n), lo cual está relacionado con un incremento de la viscosidad del material composite con respecto al material sin presencia del aditivo.

Para poder comparar de forma cuantitativa el efecto de la carboximetilcelulosa y el de la celulosa microcristalina en la viscosidad de las mezclas obtenidas con respecto a la policaprolactona pura se ha calculado el porcentaje de variación en el índice de consistencia (a) de la ecuación potencial de ajuste de los datos de viscosidad a diferentes temperaturas. Este porcentaje se ha calculado como la relación entre la diferencia del valor del parámetro de ajuste a para el material composite y el valor del mismo parámetro para la PCL pura entre el valor de a de la policaprolactona (Tabla 3).

Temperatura (°C)	Material composite	Variación del índice de consistencia con respecto a la PCL pura (%)
170	PCL:CMC 98:2	-13,1
170	PCL:MCC 98:2	33,8
170	PCL:CMC 95:5	35,8
170	PCL:MCC 95:5	21,7
190	PCL:CMC 98:2	21,1
190	PCL:MCC 98:2	31,4
190	PCL:CMC 95:5	81,9
190	PCL:MCC 95:5	25,9
210	PCL:CMC 98:2	104,0
210	PCL:MCC 98:2	104,1
200	PCL:CMC 95:5	201,7
210	PCL:MCC 95:5	112,7

Tabla 3. Comparativa de la variación de los valores del índice de consistencia para los diferentes materiales composite evaluados con respecto a la policaprolactona sin aditivo.

La observación de los porcentajes de variación presentados en la Tabla 3 permite concluir que, a igual concentración y tipo de aditivo, el porcentaje de variación es mayor cuanto mayor es la temperatura de trabajo. Además, también se observa que, a igual temperatura de trabajo, el valor de este porcentaje es superior en el caso de la celulosa microcristalina cuando la concentración de aditivo se sitúa en el 2% (p/p). Sin embargo, cuando el porcentaje de aditivo se incrementa al 5% (p/p), es posible comprobar una inversión en la tendencia.

Esta mayor viscosidad de las mezclas policaprolactona:carboximetilcelulosa puede ser uno de los parámetros fundamentales que justifiquen la peor procesabilidad de este material con respecto a las mezclas de policaprolactona:celulosa microcristalina que se describió en el *Capítulo 3. Formulación de materiales y métodos de caracterización*.

En la Tabla 4 se muestran los valores para el ajuste del modelo exponencial para las combinaciones policaprolactona-carboximetilcelulosa que se han evaluado.

$$\eta = A \cdot \exp\left(\frac{T_r}{T}\right) \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$$

Material	A	n	R <sup>2</sup>
PCL	1,600·10 <sup>4</sup>	0,3578	0,9542
PCL:CMC 98:2	2,273·10 <sup>4</sup>	0,3237	0,9907
PCL:CMC 95:5	4,841·10 <sup>4</sup>	0,2341	0,9920

Tabla 4. Valores de los parámetros de ajuste y regresión de las ecuaciones potenciales de las isotermas evaluadas para la policaprolactona y los composites basados en mezclas PCL:CMC.



El factor preexponencial (A) se incrementa un 113% entre las mezclas que contienen un 2% (p/p) de carboximetilcelulosa (A=2,273·10<sup>4</sup>) y las que contienen un 5% (p/p) de este aditivo  $(A=4,841\cdot10^4)$ . En el caso de las mezclas PCL:MCC, las combinaciones que contienen un 2% y un 5% de aditivo presentan una diferencia inferior al 5% en este parámetro; mientras que la mezcla que contiene un 10% de celulosa microcristalina tiene un valor de A de 37960, lo que supone un incremento del 52% del valor para la mezcla PCL:MCC 95:5. De esta forma, es posible concluir que las mezclas PCL:CMC presentan un incremento de la viscosidad con respecto al material puro con una dependencia más pronunciada con la concentración de aditivo. Esta tendencia está en concordancia con las conclusiones obtenidas a partir de las ecuaciones de las isotermas anteriormente presentadas y justifican las dificultades de procesabilidad de estos composites mediante técnicas de extrusión térmica.

En cuanto al modelo de segundo orden, en las siguientes tablas (Tabla 5 y Tabla 6) se presentan los valores de los parámetros de ajuste obtenidos en este estudio. En este caso, la formulación matemática no tiene una base teórica que permita relacionar los valores de los parámetros de ajuste con las tendencias de propiedades de flujo observadas, tal como se describe en el Capítulo 3. Formulación de materiales y métodos de caracterización al realizar la presentación de las principales características de este modelo.

$$\ln(\eta) = a + b \cdot \ln \dot{\gamma} + c \cdot T + d \cdot (\ln \dot{\gamma})^2 + e \cdot T \cdot \ln \dot{\gamma} + f \cdot T^2$$

Material	a	b	С	d
PCL	8,313	-1,494	0,03147	-0,03602
PCL:CMC 98:2	-3,887	-0,5651	0,06307	-0,03469
PCL:CMC 95:5	82,94	-1,249	-0,3016	-0,01946

Tabla 5. Valores de los parámetros de ajuste de la policaprolactona y sus combinaciones con carboximetilcelulosa para el modelo de segundo orden.

Material	е	f	R <sup>2</sup>
PCL	0,003102	-7,017·10 <sup>-5</sup>	0,9981
PCL:CMC 98:2	0,001011	-8,011·10 <sup>-5</sup>	0,9990
PCL:CMC 95:5	0,001841	0,0003088	0,9979

Tabla 6. Valores de los parámetros de ajuste de la policaprolactona y sus combinaciones con carboximetilcelulosa para el modelo de segundo orden (Continuación).

A partir de los coeficientes de regresión obtenidos durante el ajuste de los datos experimentales a los diferentes modelos de viscosidad analizados (Tabla 7) es posible seleccionar el modelo que realice una representación más adecuada del comportamiento de estos materiales.



Material	Modelo	R <sup>2</sup>
PCL	Exponencial	0,9542
PCL	Segundo orden	0,9981
PCL:CMC 98:2	Exponencial	0,9907
PCL:CMC 98:2	Segundo orden	0,9990
PCL:CMC 95:5	Exponencial	0,9920
PCL:CMC 95:5	Segundo orden	0,9979

Tabla 7. Coeficientes de correlación de cada modelo para las diferentes combinaciones de policaprolactonacelulosa microcristalina evaluadas.

Esta comparativa permite proponer las siguientes las ecuaciones  $\eta=f(T,\dot{\gamma})$  como las más convenientes para modelizar el flujo de los materiales analizados dentro del rango de temperaturas y velocidades de cizalla en el que se han llevado a cabo los ensayos experimentales.

- Ecuación para modelizar la policaprolactona:

$$\ln(\eta) = 8,313 - 1,494 \cdot \ln \dot{\gamma} + 0,03147 \cdot T - 0,03602 \cdot (\ln \dot{\gamma})^2 + 0,003102 \cdot T \cdot \ln \dot{\gamma} - 7.017 \cdot 10^{-5} \cdot T^2$$

- Ecuación para modelizar la mezcla PCL:CMC 98:2:

$$\ln(\eta) = -3.887 - 0.5651 \cdot \ln \dot{\gamma} + 0.06307 \cdot T - 0.03469 \cdot (\ln \dot{\gamma})^2 + 0.001011 \cdot T \cdot \ln \dot{\gamma} - 8.011 \cdot 10^{-5} \cdot T^2$$

- Ecuación para modelizar la mezcla PCL:CMC 95:5:

$$\ln(\eta) = 82,94 - 1,249 \cdot \ln \dot{\gamma} - 0,3016 \cdot T - 0,01946 \cdot (\ln \dot{\gamma})^2 + 0,001841 \cdot T \cdot \ln \dot{\gamma} + 0,0003088 \cdot T^2$$

Estas expresiones pueden ser empleadas para la simulación del empleo de los composites propuestos mediante otras técnicas térmicas de procesado diferentes a la fabricación aditiva mediante extrusión alimentada por hilo.

# 5.3. CARACTERIZACIÓN DE LÁMINAS DE MATERIAL COMPOSITE POLICAPROLACTONA: CARBOXIMETILCELULOSA

Al igual que en el caso de las mezclas policaprolactona: celulosa microcristalina, se realizó la caracterización de muestras de material composite obtenido mediante moldeo por compresión (procedimiento descrito en el Capítulo 3) con la finalidad de obtener datos que permitan valorar las propiedades del material sin introducir la variable de la calidad de la deposición durante la fabricación aditiva. Además, ciertas técnicas, como son la medición del ángulo de contacto o la espectroscopía infrarroja son difícilmente ejecutables con las piezas porosas.



#### 5.3.1. TERMOGRAVIMETRÍA

El ciclo utilizado para la determinación de la temperatura de máxima degradación de las combinaciones analizadas consistió en un calentamiento hasta 600°C a una velocidad de 20°C/min con un flujo de aire de 10 ml/min en crisol de aluminio. Las muestras de policaprolactona fueron sometidas al mismo ciclo de conformado mediante moldeo por compresión a fin de que tanto el material de referencia como las muestras de material combinado tuvieran procesados térmicos comparables.

En cuanto a la degradación térmica del material, la policaprolactona sufre una degradación que se efectúa mediante escisión específica de las cadenas <sup>4,5</sup> en torno a 430°C, mientras que la carboximetilcelulosa se degrada alrededor de los 300°C (Figura 2). Para el material composite con porcentajes bajos de aditivo (PCL:CMC 98:2 y PCL:CMC 95:5), la cantidad de carboximetilcelulosa no es suficiente como para poder apreciar la etapa de degradación de este componente. Sin embargo, para las muestras con un 10% y un 20%, es posible observar dos etapas de degradación: una primera relacionada con la carboximetilcelulosa y una segunda, con la policaprolactona, si bien la temperatura de degradación máxima de este segundo componente se ve reducida por la presencia del aditivo. De forma similar, la existencia de dos etapas de degradación ha sido observada tanto para muestras de policaprolactona aditivadas con otros componentes celulósicos, <sup>6</sup> como en el caso de la introducción de CMC en otra matriz termoplástica: el polietileno. <sup>7</sup>

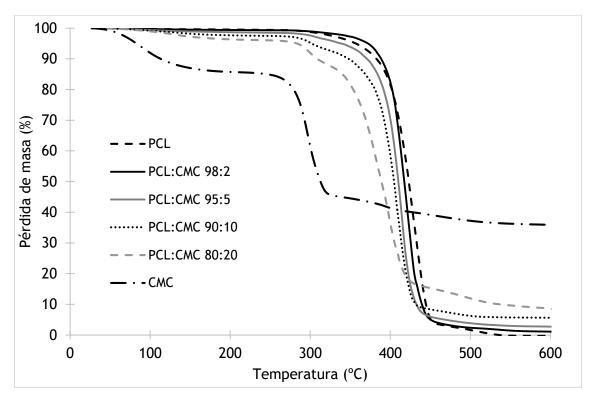


Figura 2. Curvas de termogravimetría dinámicas de policaprolactona, carboximetilcelulosa y sus combinaciones.



La presencia de carboximetilcelulosa disminuye la temperatura de degradación de la matriz de policaprolactona, tal como se muestra en los valores especificados en la Tabla 8. Esta reducción ha sido observada por otros autores al utilizar rellenos de base celulósica en matrices de policaprolactona, como son la combinación de residuos agrícolas utilizada por Ruseckaite y colaboradores<sup>6</sup> o la fibra de sisal.<sup>8</sup>

Por otra parte, el aditivo no modifica de forma significativa la temperatura y entalpía de fusión (p> 0,05). Sin embargo, sí se observa una ligera tendencia hacia el incremento en los valores de estos parámetros para bajas concentraciones de aditivo seguida de una disminución cuando se incrementa el porcentaje de carboximetil celulosa. Por su parte, el grado de cristalinidad se incrementa ligeramente, llegando a un valor máximo del 21% para una concentración de aditivo del 2%. Por consiguiente, es posible que la carboximetilcelulosa tenga un efecto de nucleación similar al ya descrito para el caso de la celulosa microcristalina, si bien en aquel caso el incremento de la cristalinidad era mucho más notorio, llegándose a alcanzar un máximo del 31% para el grupo de muestras que contienen un 5% de celulosa microcristalina. Además, al igual que se comentó en el caso de la celulosa microcristalina, el aumento de la concentración de aditivo presenta los citados máximos sobre el aumento de la cristalinidad debido a que, a concentraciones mayores, la formación de agregados de partículas de aditivo disminuye el contacto interfacial y, por consiguiente, la capacidad de las partículas para actuar como puntos de nucleación.

De esta forma, a pesar de la reducción en la temperatura de degradación del material composite con respecto a la matriz de PCL puro, dado que la temperatura de fusión se mantiene entre 61-69°C (Tabla 8), existe una ventana de temperatura suficientemente amplia para procesar las combinaciones de material composite propuestas mediante técnicas térmicas.

Material	Temperatura de máxima degradación (°C)	Temperatura de fusión (°C)	Entalpía de fusión (J/g)	Cristalinidad (%)
PCL	429	63	23	16
PCL:CMC 98:2	421	69	29	21
PCL:CMC 95:5	415	68	27	20
PCL:CMC 90:10	411	68	25	20
PCL:CMC 80:20	394	64	18	16
CMC	295	NA	NA	NA

Tabla 8. Valores de temperatura de máxima degradación, temperatura de fusión y entalpía de fusión de la policaprolactona, la carboximetilcelulosa y sus combinaciones.

Por otra parte, la observación y comparación de los termogramas obtenidos (Figura 2) permite distinguir una primera pérdida de peso entre 90-150°C relacionada con la pérdida de humedad. Por esta razón, tal como ya se mencionó en el *Capítulo 3. Formulación de materiales y métodos de caracterización*, es posible valorar la pérdida de peso a 150°C como el porcentaje de agua desorbida. Este ensayo se realizó sobre muestras que hubieran absorbido previamente la cantidad de agua en el equilibrio de



hinchamiento (48 horas de inmersión). El período de tiempo necesario para alcanzar este equilibrio se determinó a través de los resultados del análisis de absorción de agua y PBS que se muestran en el apartado siguiente.

Los resultados (Figura 3) muestran que es posible correlacionar adecuadamente (R²= 0,9967) mediante una ecuación cuadrática los valores de porcentaje de masa identificada con agua desorbida y el porcentaje de aditivo introducido en la formulación. Esta correlación es un indicativo claro de la posibilidad de modular la hidrofilicidad del material mediante la modificación del porcentaje de carboximetilcelulosa que contiene. Cabe destacar que esta correlación sirve como comparativa de la capacidad de absorción de agua de la carboximetilcelulosa y la celulosa microcristalina, ya que mientras que para el primer aditivo la relación entre la cantidad de agua retenida y la concentración es de tipo cuadrática, para la celulosa es de tipo lineal. Por consiguiente, es posible concluir que la carboximetilcelulosa ofrece una mayor capacidad de retención de agua por parte del material composite.

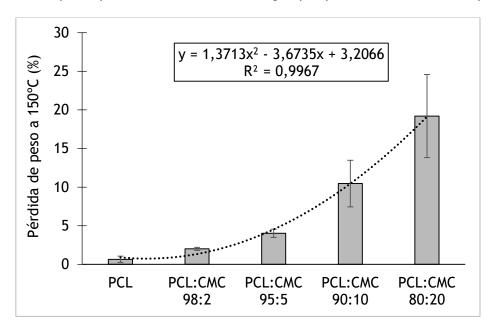


Figura 3. Correlación de pérdida de peso a 150°C (evaluada mediante TGA) y la cantidad de carboximetilcelulosa introducida en la matriz de policaprolactona.

### 5.3.2. RETENCIÓN DE TAMPÓN FOSFATO SALINO (PBS) Y AGUA

A partir de los resultados mostrados en la Figura 4 y Figura 5, es posible confirmar que la introducción de carboximetilcelulosa incrementa la hidrofilicidad del material incluso para períodos cortos de inmersión en agua y PBS. Por ejemplo, la retención de agua aumenta del 0,2% en policaprolactona pura a un 1,0% para la mezcla PCL:CMC 80:20 en una hora, así que la introducción de CMC en la mezcla permite multiplicar por cinco la cantidad de agua que el material es capaz de absorber en un período de tiempo tan corto como una hora. Esta característica fue ya descrita para los composites obtenidos por aditivación con celulosa microcristalina y, tal como se mencionó en el Capítulo 4, supone una ventaja comparativa frente a otras opciones citadas en la bibliografía para incrementar la hidrofilicidad de la policaprolactona, como puede ser el refuerzo con fibra de vidrio propuesto por Liu y colaboradores. 9



Con respecto al tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de hinchamiento, se comprueba que no hay diferencias significativas (p>0,05) entre los valores correspondientes a 24 horas de inmersión y los de 48 horas, tanto en PBS como en agua para muestras que contienen la misma concentración de aditivo. Esto implica que con un tiempo de 24 horas ya se alcanza el equilibrio de hinchamiento en las muestras de material composite.

De esta forma, si se comparan los datos de 24 horas para ambos fluidos, será posible observar si existe una dependencia del porcentaje de retención con el tipo de fluido utilizado durante el ensayo. En este sentido, cabe destacar que, si bien dicha comparativa no ofrece una diferencia significativa en términos estadísticos (p>0,05), es posible observar que existe una tendencia a una mayor retención de PBS que de agua (Figura 4 y Figura 5). Este ligero incremento puede explicarse debido a la interacción de los grupos carboxilato de la CMC con el medio iónico que proporciona el PBS.

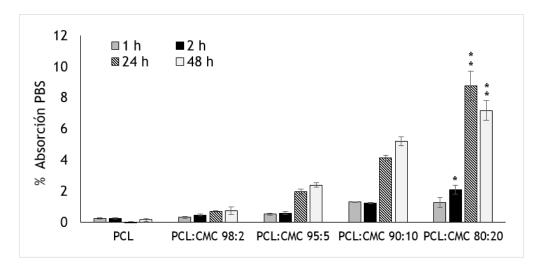


Figura 4. Absorción de PBS para la policaprolactona y sus composites para 1h, 2h, 24h y 48h de inmersión (\*p<0,05; \*\*p<0,01 comparado con el grupo equivalente de muestras de policaprolactona).

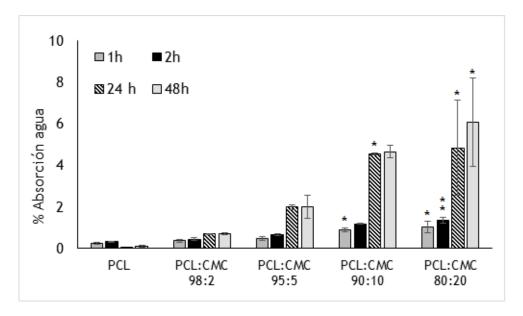


Figura 5. Absorción de agua para la policaprolactona y sus composites para 1h, 2h, 24h y 48h de inmersión (\*p<0,05; \*\*p<0,01 comparado con el grupo equivalente de muestras de policaprolactona).

Formulación, caracterización y evaluación de biomateriales para su uso con fines biomédicos utilizando fabricación aditiva.



Por último, cabe destacar que los valores de retención obtenidos son mayores en el caso de los composites basados en la aditivación con carboximetilcelulosa que con los de celulosa microcristalina. Si se comparan los datos para el equilibrio de hinchado en PBS (48 horas) el porcentaje de retención para las muestras de PCL:CMC 80:20 tiene un valor promedio de en torno al 6%, mientras que el grupo equivalente PCL:MCC 80:20 retiene un 3%. La mayor hidrofilicidad de los composites de carboximetilcelulosa se hace aún más evidente si se comparan las ecuaciones obtenidas a partir del estudio de desorción de agua mediante ciclo termogravimétrico (Figura 3), ya que en el caso de este aditivo la relación entre agua retenida y concentración es de tipo cuadrático, mientras que para la celulosa microcristalina era de tipo lineal.

#### 5.3.3. ÁNGULO DE CONTACTO

En la Tabla 9 se presentan los valores del ángulo de contacto, tanto sobre muestras secas como prehumedecidas, para la policaprolactona y sus *composites* con carboximetilcelulosa. El ángulo de contacto en estado seco se incrementa con la cantidad de carboximetilcelulosa desde el 2% al 10%, pasando de  $86,5 \pm 6,8^{\circ}$  a  $90,0 \pm 6,2^{\circ}$ , si bien este incremento no es significativo estadísticamente (p>0,05). Sin embargo, en las muestras prehumedecidas, la tendencia es opuesta: un incremento de la concentración de aditivo implica una reducción del ángulo de contacto.

Material	Ángulo de contacto sobre muestras secas	Ángulo de contacto sobre muestras prehumedecidas
PCL	86,6 ± 5,2 °	78,3 ± 4,8 °
PCL:CMC 98:2	86,5 ± 6,8 °	75,1 ± 5,0 °
PCL:CMC 95:5	92,6 ± 6,6 °	73,6 ± 4,6 ° **
PCL:CMC 90:10	99,2 ± 6,3 ° *	72,2 ± 5,2 ° **
PCL:CMC 80:20	90,0 ± 6,2 °	67,0 ± 5,5 ° **

Tabla 9. Valores del ángulo de contacto en muestras secas y prehumedecidas (\*p<0,05; \*\*p<0,01 tomando como referencia los valores del PCL puro).

El incremento del ángulo de contacto medido sobre las muestras secas sugiere una disminución de la hidrofilicidad del material conforme aumenta la concentración de aditivo. Estos resultados, que parecerían contradecir los proporcionados por los ensayos de absorción de agua y PBS, pueden justificarse por las interacciones intra- e intermoleculares por puentes de hidrógeno entre los grupos terminales cuando las muestras se encuentran secas, tal como se explica en la bibliografía. Cuando las muestras se encuentran prehumedecidas, la tendencia es la contraria: un incremento de la concentración de aditivo implica una reducción significativa del ángulo de contacto y, por tanto, una mayor hidrofilicidad superficial. Este efecto se ha observado en otros polímeros, como poli(glicerol sebacato)<sup>10</sup>, poly(hidroxietil acrilato) <sup>11</sup> y anteriormente en el poli(hidroxietil metacrilato)<sup>12</sup>, los cuales tienen una mejor disponibilidad de los grupos hidrófilos cuando se encuentran hidratados. En el trabajo



de Ratner<sup>13</sup> este efecto se denomina inversión de la estructura superficial (*reversal surface structure*) y ocurre cuando se transfieren las muestras desde el aire a un medio acuoso. Dado que en las aplicaciones de Ingeniería de Tejidos que se proponen el material se encontraría en medio acuoso, tiene una mayor relevancia la tendencia que se observa en las muestras prehumedecidas.

Otros autores han señalado problemas en la medición del ángulo de contacto en muestras de base policaprolactona tratadas para incrementar su hidrofilicidad, dado que la gota es absorbida por la muestra rápidamente cuando esta se encuentra seca. <sup>14,15</sup> Este hecho se interpreta en la bibliografía como suficiente prueba para demostrar el incremento de la afinidad por el agua de la superficie. Sin embargo, la medida del ángulo de contacto sobre muestras prehumedecidas evita este obstáculo para la obtención de resultados cuantitativos que permitan caracterizar las muestras modificadas.

Por último, cabe destacar que, si bien la reducción del ángulo de contacto que se observa en este estudio (de entre 3 y 11°) es inferior a las reducciones que se citan en la bibliografía para tratamientos con plasma (21° para el plasma con oxígeno y 31° para plasma de argón)¹6 el efecto se extiende más allá de la superficie, dado que las partículas de aditivo se encuentran en el seno del material. De esta forma, es posible resaltar este aspecto como una de las principales diferencias comparativas entre las dos alternativas para disminuir la hidrofobicidad de la policaprolactona. Otra diferencia es la durabilidad que cabe esperar del cambio en la hidrofilicidad de los materiales *composites* frente a las superficies tratadas con plasma. De hecho, Moraczewski y colaboradores¹7 determinaron que muestras de policaprolactona tratadas con plasma incrementan su ángulo de contacto entre 20° y 40° después de 9 semanas de envejecimiento. Sin embargo, en el caso de los materiales composites cabe esperar que este efecto se mantenga al menos hasta que el proceso de biodegradación tenga un impacto apreciable sobre la estructura del material.

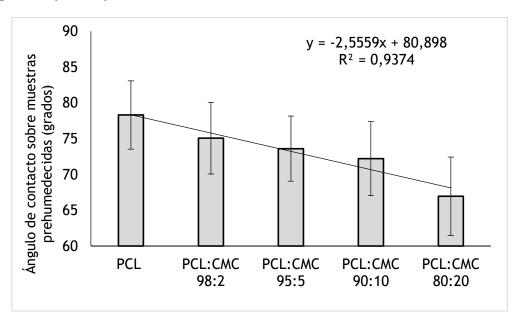


Figura 6. Valores del ángulo de contacto en las muestras prehumedecidas.



### 5.3.4. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA DISTRIBUCIÓN DE PARTÍCULAS

Las partículas de carboximetilcelulosa se distribuyen de forma heterogénea en el seno de la matriz de policaprolactona, tal como se observa en las imágenes al microscopio de la Figura 7. A pesar de que no es posible efectuar mediciones con exactitud de los aglomerados que se forman, sí es posible distinguir que hay dos tipos: un grupo por debajo de las 100 micras y otro situado en torno a las 200-300 micras de tamaño de partícula.

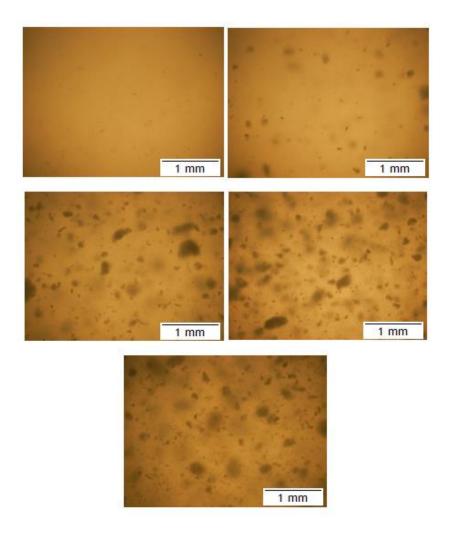
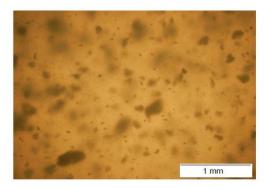


Figura 7. Fotografías al microscopio óptico de la distribución de partículas de carboximetil celulosa (PCL, PCL:CMC 98:2, PCL:CMC 95:5; PCL:CMC 90:10 y PCL:CMC 80:20). Escala: 1 mm.

Esta variabilidad de la forma y tamaño de los agregados que se forman también se observó en el caso de la aditivación de la celulosa microcristalina (Capítulo 4). En la Figura 8 se muestran las imágenes de muestras aditivadas con un 10% de carboximetilcelulosa y celulosa microcristalina, respectivamente. A partir de esta figura, es posible confirmar que la tendencia a la aglomeración es superior en el caso de la carboximetilcelulosa, puesto que los agregados que se observan son de un tamaño superior y menos uniformes que en el caso de la celulosa microcristalina.





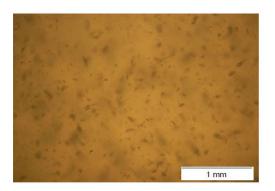


Figura 8. Comparativa de fotografías al microscopio óptico de la distribución de partículas de carboximetil celulosa (10% p/p) (izquierda) y celulosa microcristalina (10% p/p) (derecha). Escala: 1mm.

#### 5.3.5. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

En las Figura 9 y Figura 10 se muestra el espectro infrarrojo de la policaprolactona y los composites obtenidos por aditivación con carboximetilcelulosa. La carboximetilcelulosa muestra una señal a 1600 cm $^{-1}$  característica del grupo carboximetil éter. <sup>18</sup> La banda ancha situada entre 3000 y 3500 cm $^{-1}$  se explica debido a la presencia de grupos hidroxilo en la CMC, mientras que las bandas a 1415 y 1325 cm $^{-1}$  corresponden a la flexión los CH $_2$  y los OH, respectivamente.

En todos los espectros analizados, es posible identificar las mismas señales atribuibles a la PCL: la banda característica a 1720 cm<sup>-1</sup> identifica a la tensión del carbonilo del grupo éster<sup>19,20</sup> y los picos a 2946 y 2870 cm<sup>-1</sup> que corresponden con la tensión asimétrica y simétrica de los CH<sub>2</sub>.<sup>21</sup>

La ausencia de modificaciones en el pico a 1720 cm<sup>-1</sup> del carbonilo permite descartar la existencia de interacciones importantes entre este grupo funcional y los grupos presentes en la estructura de la CMC. Por otra parte, en la Figura 10 es posible observar que mediante la metodología utilizada para la evaluación del espectro infrarrojo de los diferentes materiales, el único grupo de muestras en el que es posible observar la señal del carboxilato alrededor de los 1590 cm<sup>-1</sup> es el PCL:CMC 80:20, de tal manera que es este espectro el que se toma como referencia para la evaluación de la interacción entre los componentes que forman la mezcla. En él, es posible observar que no aparecen señales adicionales a las de los componentes puros, lo que permite concluir que la espectroscopia infrarroja no señala ninguna interacción relevante entre la CMC y la PCL en los materiales composites propuestos.

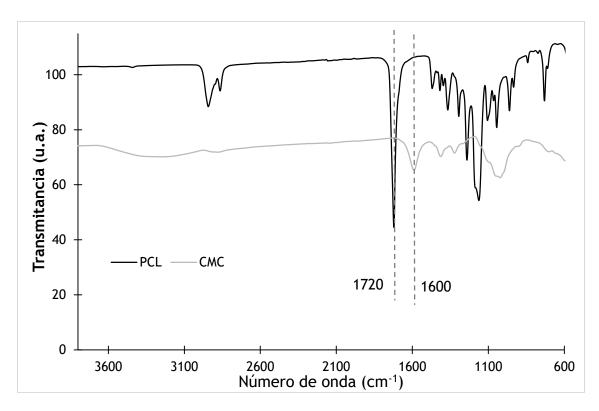


Figura 9. Espectro infrarrojo de la policaprolactona y la carboximetilcelulosa.

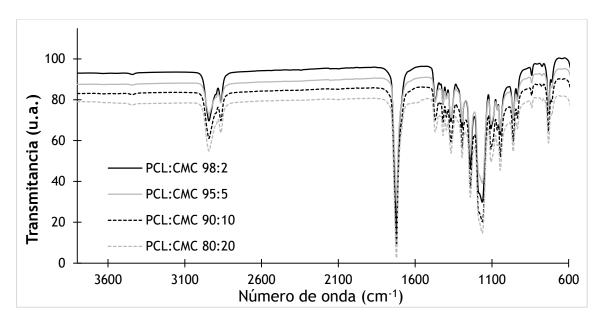


Figura 10. Espectro infrarrojo de los composites policaprolactona; carboximetil celulosa.

Tal como se explicó en el *Capítulo 4. Evaluación de la celulosa microcristalina como aditivo*, la espectroscopía infrarroja puede emplearse para analizar la cristalización de la policaprolactona y sus mezclas. <sup>22,23</sup> Para ello, se ha analizado la relación de las intensidades de lo del pico de estiramiento asimétrico relacionado con la fase amorfa del CH<sub>2</sub> (2945 cm<sup>-1</sup>) <sup>24</sup> y del pico del estiramiento simétrico del C-O-C (1245 cm<sup>-1</sup>), relacionado con la fase cristalina. <sup>24</sup> En la Tabla 10 es posible observar los



valores de la relación de las áreas de ambos picos como medida de su intensidad relativa.

Como puede comprobarse, los datos para los composites PCL:CMC son ligeramente superiores a los de la policaprolactona pura. Esta tendencia está en contradicción con el incremento de la cristalinidad evidenciado por los datos del análisis calorimétrico (Tabla 8). En el caso de los composites PCL:CMC el máximo de cristalinidad observado fue de un 21%, mientras que para las combinaciones PCL:MCC, el máximo fue de un 31%. Por tanto, en este último caso, el notorio cambio en la cristalinidad implica un cambio asociado en la relación de las áreas de los picos de CH<sub>2</sub> y C-O-C. Por su parte, el cambio mostrado en el caso de las formulaciones PCL:CMC es menor y es posible que no se evidencie en los datos obtenidos por espectroscopía infrarroja.

Material	Relación de áreas (pico CH <sub>2</sub> /pico C-O-C)
PCL	1,34±0,11
PCL:CMC 98:2	1,67±0,16
PCL:CMC 95:5	1,37±0,27
PCL:CMC 90:10	1,63±0,09
PCL:CMC 80:20	1,43±0,18

Tabla 10. Relación de áreas de los picos FTIR (CH<sub>2</sub> en fase amorfa/C-O-C en fase cristalina).

#### 5.3.6. ENSAYOS DE TRACCIÓN

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos mecánicos a tracción de láminas obtenidas mediante moldeo de compresión de policaprolactona y sus composites con diferentes concentraciones de carboximetilcelulosa. Un análisis de varianza a través del test de Wilcoxon dos a dos de cada uno de los valores del límite elástico de los composites frente a la policaprolactona pura, muestra que existe una disminución significativa (p<0,05) para las composiciones que contienen un 5 y un 10% de aditivo.

Sin embargo, no existe diferencia significativa en cuanto a los valores del módulo de elasticidad, si bien sí se observa un aumento considerable de la desviación típica de los resultados obtenidos como consecuencia de la heterogénea distribución de las partículas de material en la matriz de policaprolactona. Además, si bien la diferencia no es estadísticamente significativa, cabe destacar el hecho de que todos los valores promedio del módulo elástico de los materiales composite son superiores al valor de la policaprolactona sin aditivar (275,8 MPa). Este efecto de incremento de la rigidez del material ya se describió en el caso de la celulosa microcristalina y es característico de los materiales composites obtenidos por adición de un componente no termoplástico cuyas partículas actúan como puntos de discontinuidad de la matriz



y que provocan, además, un incremento de su cristalinidad. En este caso, sin embargo, el aumento del módulo de elasticidad no es lineal a la concentración de aditivo introducido. Esta no linealidad se debe al tipo de agregados que se forman en las formulaciones PCL:CMC, mucho más numerosos y heterogéneos que en el caso de las combinaciones PCL:MCC.

Por otra parte, la comparativa de los resultados con los datos equivalentes para el estudio de la formulación de materiales composites basados en la introducción de celulosa microcristalina proporciona otras observaciones interesantes. En el caso de la celulosa microcrisalina, la introducción de un 10% p/p de aditivo proporcionaba un aumento de un 44% del módulo de elasticidad. En este caso, para la misma cantidad de aditivo la diferencia es de tan solo un 12%. El mayor incremento de la rigidez en el caso de los composites obtenidos por la introducción de la celulosa microcristalina se justifica por el mayor efecto de aquel aditivo para incrementar la cristalinidad de la matriz, tal como demuestran los resultados del estudio calorimétrico (Tabla 8 y datos presentados en el Capítulo 5).

Material	Módulo de elasticidad (MPa)	Límite elástico (MPa)
PCL	275,8±15,2	15,5±0,6
PCL:CMC 98:2	298,8±13,7	14,7±0,8
PCL:CMC 95:5	279,0±13,1	13,8±0,6*
PCL:CMC 90:10	309,3±39,8	12,1±0,7*

Tabla 11. Resultados ensayos de tracción láminas obtenidas por compresión de policaprolactona y composites policaprolactona:carboximetilcelulosa (\*p<0,05).

#### 5.3.7. CULTIVO CELULAR Y EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

De forma similar al procedimiento explicado en el Capítulo 4 para las formulaciones basadas en la aditivación de la policaprolactona con celulosa microcristalina, se realizó un análisis de citotoxicidad de muestras de láminas obtenidas mediante moldeo por compresión de policaprolactona:carboximetilcelulosa.

Para ello, se realizó un cultivo de fibroblastos de ratón de línea L929. Este estudio se realizó con cuatro réplicas que consistían en discos de 7 mm de diámetro sanitarizadas con etanol 70° durante 2 horas. A continuación, estas fueron lavadas con etanol 50°, etanol 30° y tres veces con agua (10 min/paso) para eliminar el etanol que pudiera haber quedado absorbido. Las muestras se acondicionaron con medio de cultivo basal durante una noche a 37°C. Como control positivo de viabilidad, se utilizaron cubreobjetos circulares de vidrio del mismo diámetro. Tanto los cubreobjetos como las muestras de material, se dispusieron en el fondo de los pocillos de una placa de cultivo y se sembraron 20000 células por muestra. Las células se cultivaron durante 1, 2 y 4 días.

Para determinar la tasa de proliferación, las células fueron lisadas con Tris-HCl pH 7,4 10 mM + Triton X-100 1% + EDTA 1 mM durante 30 minutos a 4°C. Se cuantificó el ADN de las células, mediante el protocolo Quant-iT Pico Green, teniendo en cuenta que la cantidad de ADN presente en cada muestra es de 22,25 pg/célula, valor que se



basa en el estudio de Chiu y colaboradores. <sup>25</sup> Este dato permite correlacionar los datos espectroscópicos con el número de células presentes en cada muestra.

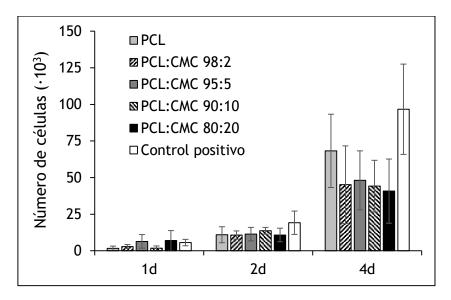


Figura 11. Número de células a lo largo del cultivo de fibroblastos en muestras de PCL y PCL:CMC tras 1, 2 y 4 días.

A partir de los datos mostrados en la Figura 11, es posible confirmar que la introducción de la CMC no provoca que el composite adquiera naturaleza citotóxica, ya que las células se multiplican a lo largo de los 4 días de ensayo, aunque tampoco se observa una mejora de la afinidad celular del material soporte. Existe una tendencia que, sin ser significativa desde el punto de vista estadístico, muestra que para 4 días de cultivo la proliferación celular sobre las muestras que contienen carboximetilcelulosa es menor que para la muestra de referencia de policaprolactona pura. Esta disminución puede deberse a que el aumento de hidrofilicidad del material dificulte la adsorción de proteínas extracelulares que jueguen un papel en el proceso de adhesión y señalización.<sup>26</sup>

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en la evaluación biológica de las muestras PCL:MCC (Capítulo 4), se comprueba que en aquel caso sí existe un aumento de la afinidad biológica de los composites al ser comparados con el grupo de muestras de policaprolactona pura. En este punto, cabe mencionar que ambos cultivos se han realizado con diferentes líneas celulares y ensayos de seguimiento, lo que limita parcialmente la comparativa paralela de los resultados. Sin embargo, como se ha empleado en ambos casos un grupo de muestras de policaprolactona sin aditivar a modo de blanco del ensayo, sí es posible obtener conclusiones relativas acerca de la existencia de una mejora frente a este grupo en ambos casos. Esta comparativa, a pesar de las limitaciones mencionadas, es de utilidad a fin de valorar el efecto del aditivo en términos relativos a ese grupo de referencia.

Tal como se ha mencionado, la carboximetilcelulosa provoca un mayor incremento de la hidrofilicidad del material que la celulosa microcristalina. De hecho, es posible que este incremento sea excesivo para fomentar los procesos de anclaje y proliferación celulares, mientras que en el caso de la celulosa microcristalina se mantenga en el rango de valores que lo favorecen. No obstante, también es posible que la introducción del aditivo conlleve una modificación de la topografía superficial,



siendo esta modificación desfavorable para los procesos de colonización de la superficie del material.

#### 5.4. FABRICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES

Tal como se explicó en el Capítulo 3. Formulación de materiales y métodos de caracterización, los materiales composites obtenidos por aditivación con carboximetilcelulosa tienen problemas de procesabilidad al tratar de obtenerse estructuras tridimensionales por el método de impresión utilizado en el presente estudio.

Estos problemas son frecuentes cuando se trabaja con un 5% de aditivo o porcentajes superiores. La diferencia de procesabilidad con respecto a las mezclas que contienen celulosa microcristalina puede deberse a la formación de aglomerados de partículas que favorezcan la obturación de la boquilla y/o la acumulación de material en la zona fría de la impresora. Además, la elevada viscosidad de las mezclas que contienen un 5% p/p de aditivo, dificulta la salida de material favoreciendo los procesos de obturación. El incremento de la viscosidad queda evidenciado por el aumento del factor preexponencial del modelo exponencial de viscosidad, que se incrementa un 113% con respecto a la formulación PCL:CMC 98:2, tal como se describió en el apartado 5.2. Propiedades de flujo.

La aparición de aglomeraciones de tamaño significativo con respecto al diámetro de la boquilla (0,4 mm) es evidente cuando se observan filamentos de material obtenidos durante la limpieza del dispositivo (Figura 12). Estos problemas de procesabilidad, unidos a los resultados de los ensayos mecánicos que se presentan a continuación, permiten concluir que la fabricación de piezas con porcentajes superiores al 2% de carboximetilcelulosa es desaconsejable para la impresión de piezas mediante la técnica utilizada en esta tesis doctoral (fabricación aditiva por extrusión térmica alimentada por hilo).

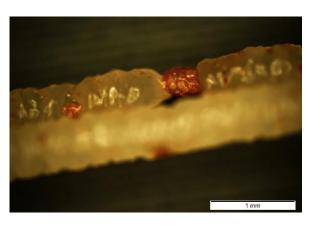


Figura 12. Detalle de filamento obtenido durante la limpieza de la impresora tridimensional.

# 5.5. CARACTERIZACIÓN DE ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES POLICAPROLACTONA: CARBOXIMETILCELULOSA

Al igual que en el caso de las combinaciones policaprolactona: celulosa microcristalina, las estructuras tridimensionales obtenidas con las formulaciones policaprolactona: carboximetil celulosa han sido sometidas a la caracterización de su morfología, sus propiedades mecánicas, su hidrofilicidad y su funcionalidad biológica a fin de establecer la viabilidad de su aplicación para aplicaciones relacionadas con la regeneración de hueso.

#### 5.5.1. MORFOLOGÍA DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES

Tanto las piezas fabricadas con material composite PCL:CMC 98:2, como las fabricadas con PCL:CMC 95:5 tienen una estructura de poros regulares e interconectados (Figura 13). No obstante, es posible observar que en las piezas que contienen un 5% de carboximetilcelulosa existe una gran deformación de los filamentos, con la presencia de microporos que pueden llegar a afectar a la adhesión entre capas de las piezas impresas. Esta deformación se justifica por un empeoramiento del proceso de deposición durante la impresión y también pudo confirmarse para el caso de las estructuras PCL:MCC 90:10 (Capítulo 4. Evaluación de la introducción de celulosa microcristalina como aditivo).

Las dificultades durante el proceso de deposición son notables durante la fabricación de la pieza ya que, tal como se explicó anteriormente, los filamentos que contienen un porcentaje superior al 2% de carboximetilcelulosa ofrecen problemas de obturación de la boquilla, haciendo inviable la fabricación del número de muestras necesarias para llevar a cabo la fase de caracterización para una concentración del 10% en aditivo, razón por la que la combinación PCL:CMC 90:10 no se incluye en los posteriores apartados de este capítulo.

Esta dificultad afectará, además, a las propiedades mecánicas de la estructuras composites policaprolactona:carboximetilcelulosa y limita la cantidad de aditivo que es posible introducir en la formulación siguiendo el procedimiento empleado en el presente estudio.

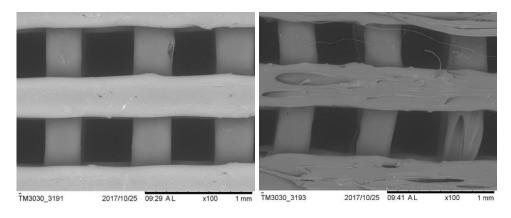


Figura 13. Imágenes al microscopio electrónico PCL:CMC 98:2 y PCL:CMC 95:5. (Escala: 1 mm)



#### 5.5.1.1. OBSERVACIÓN EN MICROCT

Las imágenes obtenidas mediante microCT permiten observar cómo la distribución de la carboximetilcelulosa es bastante heterogénea, pudiéndose distinguir una gran cantidad de aglomerados (Figura 14 y Figura 15). Esta distribución de las partículas de carboximetilcelulosa dificulta una adecuada adhesión entre capas, lo que afectará notablemente a las propiedades mecánicas de las estructuras obtenidas con este material composite.

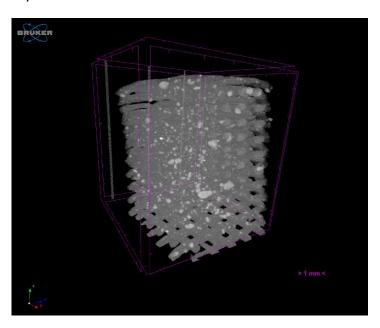


Figura 14. Imagen obtenida mediante microCT de pieza PCL:CMC 98:2 (Barra de escala: 1mm).

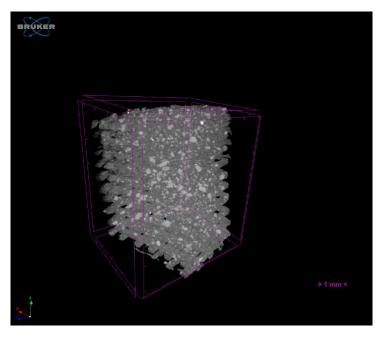


Figura 15. Imagen obtenida mediante microCT de pieza PCL:CMC 95:5 (Barra de escala: 1mm).



#### 5.5.1.2. POROSIDAD

La caracterización de la porosidad a través de la relación entre la densidad de la estructura porosa y la densidad del material permitió obtener los resultados recogidos en la Tabla 12 y la Tabla 13. Las mezclas de carboximetilcelulosa y policaprolactona muestran un incremento significativo (p<0,05) de los valores de la densidad del material con respecto a la matriz sin aditivar. Este incremento no es tan relevante como en el caso de la celulosa microcristalina, ya que las muestras de material composite que contienen un 2% de aditivo en aquel caso muestran una densidad de 1,16 g/cm³ y las que contien un 5%, tienen una densidad de 1,23 g/cm³.

Tal como se mencionó en el Capítulo 4. Evaluación de la introducción de la celulosa microcristalina como aditivo, un incremento de la densidad del material composite está relacionado con un aumento de la cristalinidad de la policaprolactona matriz. De esta forma, el hecho de que los valores de las mezclas policaprolactona:celulosa microcristalina sean superiores de los carboximetilcelulosa (Tabla 12), unido a los resultados calorimétricos presentados en el correspondiente apartado de este capítulo, permiten confirmar que el efecto de nucleación es más relevante en el caso de las partículas de celulosa microcristalina que en el de la carboximetilcelulosa.

Material	Densidad (g/cm³)
PCL	1,10±0,02
PCL:CMC 98:2	1,14±0,02 *
PCL:CMC 95:5	1,12±0,01 *

Tabla 12. Valores de densidad de la policaprolactona y combinaciones con carboximetilcelulosa (\*p<0,05 comparado con los datos correspondientes a la PCL pura).

Por otra parte, los valores de densidad aparente se sitúan entre 0,52 y 0,56 g/cm³ para los tres grupos de piezas evaluados (PCL, PCL:CMC 98:2 y PCL:CMC 95:5) (Tabla 13). La distancia entre filamentos es muy similar cuando se comparan la serie de datos de las piezas de policaprolactona y las de material composite con un 2% de carboximetilcelulosa (Tabla 13). Sin embargo, cuando la concentración de aditivo se eleva hasta el 5%, existe una disminución altamente significativa del tamaño de poro. Esta desviación tiene su justificación en las irregularidades de la estructura como consecuencia del empeoramiento del proceso de deposición, tal como se menciona en los apartados precedentes y como puede observarse en las fotografías tomadas mediante microscopía electrónica (Figura 13).

A pesar de la existencia de esa diferencia, es importante destacar que los tamaños de poro en las estructuras analizadas continúan dentro del intervalo adecuado para aplicaciones de regeneración ósea (150-500 µm)<sup>27,28</sup>, ya mencionado en el capítulo dedicado al análisis de los resultados de la caracterización de las piezas obtenidas con materiales composites policaprolactona:celulosa microcristalina.



Material	Densidad aparente (g/cm³)	Porosidad (%)	Distancia entre filamentos (µm)
PCL	0,52±0,03	52,3±2,5	463±26
PCL:CMC 98:2	0,56±0,02*	50,6±2,0	462±45*
PCL:CMC 95:5	0,53±0,02	53,1±1,8	422±35***

Tabla 13. Datos de porsosidad de piezas impresas de policaprolactona y sus combinaciones con carboximetilcelulosa (\* p<0,05; \*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001 tomando como referencia el conjunto de datos de la PCL

#### 5.5.2. ENSAYOS MECÁNICOS

#### 5.5.2.1. ENSAYOS DE COMPRESIÓN

Al contrario que en el caso de la celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa no tiene un efecto de refuerzo de la matriz de policaprolactona, ya que el módulo de compresión disminuye al introducir este aditivo en la formulación Tabla 14). La disminución de las propiedades mecánicas se justifica teniendo en cuenta que, de acuerdo con las imágenes obtenidas por microCT (Figura 14 y Figura 15), las partículas de carboximetilcelulosa forman unos aglomerados que debilitan la estructura tridimensional. Por otra parte, la heterogénea distribución de material dificulta el proceso de deposición, lo que provoca que los filamentos que contienen un 5% p/p de carboximetilcelulosa tengan escasa integridad morfológica, tal como se observa en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica (Figura 13).

Además, el escaso efecto de nucleación de este aditivo (evidenciado por los datos de la caracterización térmica y los datos de densidad) no favorece un incremento suficiente de la cristalinidad de la matriz, proceso que justifica el efecto de refuerzo observado en el caso de la celulosa microcristalina.

Material	Módulo de elasticidad a compresión (MPa)	Límite elástico (MPa)
PCL	25,2 ± 3,3	2,1 ± 0,2
PCL:CMC 98:2	18,7 ± 3,1	2,1 ± 0,1
PCL:CMC 95:5	12,5 ± 4,0*	2,3 ± 0,5

Tabla 14. Parámetros mecánicos a compresión para las combinaciones de policaprolactona- carboximetilcelulosa evaluadas.

No obstante, el grupo de muestras que contiene un 2% p/p de este aditivo no propornciona una diferencia significativa con respecto a la policaprolactona (p>0,05). Estos valores están en el rango de estructuras similares de policaprolactona para aplicaciones en regeneración de hueso, 29 si bien se sitúan en el límite inferior del intervalo de entre 20-500 MPa referenciado como valor del módulo de elasticidad del hueso trabecular. 30,31



#### 5.5.2.2. ENSAYOS DE FLEXIÓN EN TRES PUNTOS

Tal como se comprueba en el apartado anterior, el módulo de compresión de las piezas que contienen un 5% p/p de carboximetilcelulosa es un 50% inferior a las piezas de policaprolactona pura (Tabla 14). Debido a este dato, unido a la inadecuada procesabilidad de la combinación, se decidió realizar las siguientes etapas de caracterización exclusivamente con las piezas que contienen un 2% de aditivo, debido a que son las únicas con potencial para la aplicación de regeneración ósea.

En cuanto a los resultados de los ensayos, es posible destacar que el módulo de flexión no varía con la introducción del aditivo de manera significativa (p>0,05). De igual forma, la disminución de la tensión máxima observada (Tabla 15) no es significativa desde el punto de vista estadístico, si bien es relevante desde el punto de vista físico, ya que es un 17% menor al valor observado para las muestras fabricadas en policaprolactona.

Material	Módulo de elasticidad a flexión (MPa)	Tensión máxima (MPa)
PCL	20,9 ± 2,0	5,9 ± 0,5
PCL:CMC 98:2	19,9 ± 6,6	4,9 ± 1,3

Tabla 15. Parámetros mecánicos a flexión para las combinaciones de policaprolactona:carboximetilcelulosa evaluadas.

A la vista de los resultados obtenidos, se propone mejor la dispersión del aditivo en el filamento con el que se alimenta la impresora tridimensional utilizada para la fabricación de las estructuras porosas tridimensionales PCL:CMC. Para ello, podría emplearse la ya mencionada estrategia de obtener previamente pellets de una mayor homogeneidad mediante el empleo de sucesivas etapas de extrusión.<sup>32</sup>

# 5.5.3. ESTUDIO DE LA HIDROFILICIDAD MEDIANTE EL ANÁLISIS DE LA ABSORCIÓN DE PBS

En la Figura 16 se presentan los datos de retención de PBS para piezas obtenidas por fabricación aditiva con policaprolactona y sus composites con carboximetilcelulosa. La introducción del aditivo incrementa la capacidad de retención de PBS cuando la concentración de la carboximetilcelulosa en el composite es de un 5% p/p, pasando de un 5% de incremento de peso en las piezas húmedas con respecto a las secas en el grupo de PCL pura a un 17% en el caso de las piezas PCL:CMC 95:5 en la primera hora de inmersión. Sin embargo, este efecto no es apreciable para el caso de las estructuras de PCL:CMC 98:2.

Este efecto también se observaba en el caso de los datos de las piezas PCL:MCC presentados en el *Capítulo 4. Evaluación de la introducción de la celulosa microcristalina como aditivo*. En aquel caso, para una hora inmersión en PBS, los valores fueron de un  $5,4\pm3,7\%$  de retención en el caso de la PCL, un  $4,5\pm0,9\%$  para las piezas PCL:MCC 98:2, un  $14,8\pm3,3\%$  para el grupo PCL:MCC 95:5 y un  $6,9\pm1,2\%$  para las estructuras PCL:MCC 90:10.

La comparación de estos valores con los obtenidos para las mezclas PCL:CMC permite corroborar las conclusiones alcanzadas con los datos de absorción de PBS y



agua obtenidos con piezas fabricadas mediante moldeo por compresión: la carboximetilcelulosa es capaz de proporcionar un material composite más hidrofílico que los basados en mezclas PCL:MCC.

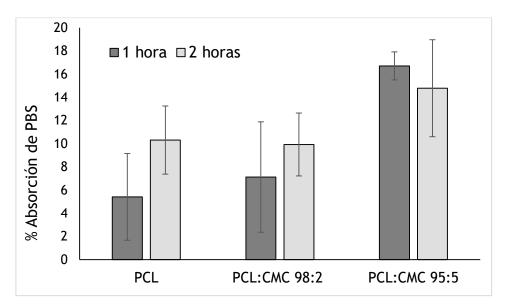


Figura 16. Porcentaje de absorción de PBS para policaprolactona y sus composites con carboximetilcelulosa.

Por último, cabe destacar que estos datos deberán ser completados en el futuro con un análisis del efecto del aditivo sobre la velocidad de degradación del material, así como sobre los subproductos generados.

#### 5.5.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS

Para el cultivo sobre estructuras tridimensionales se usaron, al igual que en el caso descrito para las piezas porosas construidas con combinaciones de policaprolactona: celulosa microcristalina, discos de 8 mm de diámetro troquelados a partir de rectángulos de 15x25 mm con un espesor de 3 mm. Al igual que en el aquel caso, las células empleadas fueron mesenquimales de oveja obtenidas por cultivo primario.

El proceso de siembra fue también dinámico, empleándose en esta ocasión una cantidad de 150000 células por muestra y llevándose a cabo una metodología de cultivo idéntica a la descrita en el Capítulo 4. Evaluación de la introducción de celulosa microcristalina como aditivo, siendo la única diferencia el contenedor de las muestras durante el cultivo, que en este caso fueron tubos de ensayo de 15 ml de volumen (Figura 17) con un volumen de medio de cultivo de 8 ml.





Figura 17. Tubos de ensayo que contienen las muestras durante la realización del cultivo celular.

Las muestras se analizaron por triplicado y se compararon exclusivamente muestras de policaprolactona y muestras que contienen un 2% de carboximetilcelulosa. Las combinaciones con un mayor contenido de aditivo no fueron consideradas para su evaluación biológica, dado que los resultados del resto de ensayos confirmaron que no tienen unas características adecuadas desde el punto de vista morfológico y de propiedades mecánicas.

Con respecto a la metodología seguida para evaluar la viabilidad de las células cultivadas, el ensayo llevado a cabo fue el Alamar Blue ® (Thermo Fisher Scientific) en los días 1, 3, 6 y 8 del cultivo. En cada uno de estos puntos de muestreo, se retiró el medio de los tubos, se lavaron los *scaffolds* con PBS y se transfirieron a nuevos tubos. Se añadieron 8 ml de medio con un 10% v/v de reactivo Alamar Blue y se procedió a la incubación de las muestras durante 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se extrajeron del medio dos alícuotas de 100  $\mu$ l y se midió su fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 540 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm en un lector de placas Tecan Infinite Pro 200. Como control negativo se usaron muestras de la solución de reactivo incubados de la misma forma que las muestras pero sin células.

En la Figura 18 se observan los datos de fluorescencia obtenidos mediante este procedimiento a lo largo del desarrollo del cultivo celular. Como puede comprobarse, el anclaje celular en el día 1 es significativamente superior (p<0,05) para las piezas con aditivo que para las fabricadas con policaprolactona pura. Si se comparan estos resultados con los obtenidos en el cultivo sobre muestras planas obtenidas mediante moldeo por compresión (Figura 11) es posible comprobar que el efecto del aditivo es diferente en ambos casos: para las muestras planas la presencia de la carboximetilcelulosa no afectaba al proceso de anclaje, mientras que sí existe una influencia cuando se analizan las piezas impresas. Esta diferencia de comportamiento puede deberse a que en las piezas tridimensionales el área superficial disponible es mucho mayor y, por consiguiente, existe una mayor probabilidad de que las células encuentren un punto rico en partículas de carboximetilcelulosa, con una señalización química diferente al resto de la matriz que favorece los procesos de anclaje celular.

Sin embargo, este anclaje parece no ser lo suficientemente estable para un gran porcentaje de individuos de la población de células cultivadas a largo tiempo, puesto que en el día 3 se observa un evidente descenso del valor promedio de la



fluorescencia, mientras que en el grupo de muestras de policaprolactona existe una tendencia clara de crecimiento de la población. No obstante, a partir de esa caída inicial, existe posteriormente una recuperación importante, ya que la tasa de incremento de señal de fluorescencia entre los días 3 y 6 es de un 41% para la policaprolactona y un 57% para la mezcla PCL:CMC98:2. Esta mejora de la proliferación celular es más evidente cuando se analiza el crecimiento entre los días 6 y 8, ya que en el caso del grupo de muestras de policaprolactona, el valor de la fluorescencia permanece prácticamente constante (incremento del 2%) y para las muestras con aditivo la señal crece en un 17%.

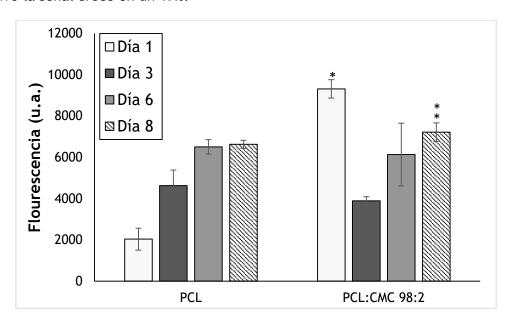


Figura 18. Resultados del ensayo de viabilidad celular para las muestras impresas de policaprolactona y la combinación que contiene un 2% de carboximetilcelulosa (\* p<0,05; \*\* p<0,01 tomando como referencia la policaprolactona pura).

La mejora de la afinidad celular en las piezas porosas no se corresponde con los datos obtenidos para las muestras obtenidas mediante moldeo por compresión (Figura 11) en los que no se observó una diferencia significativa entre el grupo de policaprolactona pura y los composites. Esta diferencia puede justificarse por la mayor área superficial que proporcionan las estructuras tridimensionales, lo que redunda en una mayor accesibilidad a zonas ricas en el aditivo que tienen una mayor hidrofilicidad y que, por tanto, favorecen la proliferación celular.

De esta forma, se observa la importancia que tiene el proceso de fabricación para el aprovechamiento de las propiedades del material en este tipo de aplicaciones.



#### 5.6. CONCLUSIONES

El material composite policaprolactona: carboximetil celulosa ofrece una mayor afinidad por el agua que la policaprolactona pura, lo que se evidencia a partir de los datos de retención de agua y PBS, así como de las medidas del ángulo de contacto obtenidos en las muestras de este material obtenidas mediante moldeo por compresión. De hecho, se observa una correlación de tipo cuadrático entre la concentración de aditivo y la hidrofilicidad del material en base a los resultados obtenidos por termogravimetría. Esta característica tiene un gran potencial en vistas a obtener estructuras con gradiente de hidrofilicidad que pueden ser de interés para ciertas aplicaciones de Ingeniería de Tejidos.

Los datos calorimétricos, los valores de densidad del material y los ensayos mecánicos a tracción de láminas obtenidas por moldeo por compresión evidencian que el efecto de nucleación y consiguiente incremento de la cristinalidad es inferior en el caso del empleo de la carboximetilcelulosa como aditivo que en el de la celulosa microcristalina analizado en el capítulo anterior. Por esta razón, no existe un efecto de refuerzo de la matriz tal como evidencian los resultados de los ensayos mecánicos. Este aspecto limita el potencial de las estructuras propuestas para la regeneración de hueso, pudiéndose concluir las formulaciones policaprolactona: celulosa microcristalina tienen unas características más apropiadas para esta aplicación.

En cuanto a la impresión tridimensional de piezas porosas, la carboximetilcelulosa presenta ciertos problemas de procesabilidad para la utilización de la técnica de fabricación aditiva empleada en el presente estudio. Así, el límite de concentración de aditivo que es posible introducir en la formulación para la impresión de piezas es inferior en el caso de la carboximetilcelulosa que para la celulosa microcristalina, obteniéndose una estructura defectuosa con un 5% p/p de aditivo, frente al 10% p/p observado en el caso de la celulosa microcristalina.

A lo largo de este capítulo se ha podido corroborar que la presencia de aglomerados de partículas de carboximetilcelulosa puede jugar un papel fundamental en estos problemas de procesabilidad. Por consiguiente, una mejora de la distribución de las partículas en el material composite podría ampliar el límite de concentración máxima admisible para la impresión de material. Si bien la búsqueda de un método de mezclado alternativo no ha sido abordada en este trabajo, sí es una línea futura muy interesante en vistas a ampliar el potencial de este material. En este sentido, se propone la evaluación de la obtención de pellets mediante sucesivas etapas de extrusión con un dispositivo de doble husillo como paso previo a la fabricación del filamento que posteriormente se emplea como alimentación a la impresora tridimensional.

Por otra parte, otra alternativa para mejorar las propiedades de flujo del material aditivado con carboximetilcelulosa es el mezclado con otros termoplásticos con unas características más adecuadas para ser procesados mediante modelado por deposición fundida, como puede ser la introducción en la formulación de ácido poliláctico. Este material podría incrementar la rigidez del filamento y, posiblemente, facilitar el proceso de deposición. Además, se trata de un material biocompatible y



con unas características adecuadas para su utilización en la regeneración de tejido óseo.



#### 5.7. REFERENCIAS

- 1. Pasqui D, Torricelli P, De Cagna M, Fini M, Barbucci R. Carboxymethyl cellulose Hydroxyapatite hybrid hydrogel as a composite material for bone tissue engineering applications. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2014;102(5):1568-1579.
- 2. Odabas S. Collagen-carboxymethyl cellulose-tricalcium phosphate multilamellar cryogels for tissue engineering applications: Production and characterization. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 2016;31(4):411-422.
- 3. Singh BN, Panda NN, Mund R, Pramanik K. Carboxymethyl cellulose enables silk fibroin nanofibrous scaffold with enhanced biomimetic potential for bone tissue engineering application. Carbohydrate Polymers 2016;151:335-347.
- 4. Sivalingam G, Karthik R, Madras G. Kinetics of thermal degradation of poly(ε-caprolactone). Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 2003;70(2):631-647.
- 5. Sivalingam G, Madras G. Thermal degradation of poly (ε-caprolactone). Polymer Degradation and Stability 2003;80(1):11-16.
- 6. Hejna A, Formela K, Saeb MR. Processing, mechanical and thermal behavior assessments of polycaprolactone/agricultural wastes biocomposites. Industrial Crops and Products 2015;76:725-733.
- 7. Mir S, Yasin T, Siddiqi HM, Murtaza G. Thermal, Rheological, Mechanical and Morphological Behavior of High Density Polyethylene and Carboxymethyl Cellulose Blend. Journal of Polymers and the Environment 2016:1-10.
- 8. Ruseckaite RA, Jiménez A. Thermal degradation of mixtures of polycaprolactone with cellulose derivatives. Polymer Degradation and Stability 2003;81(2):353-358.
- 9. Liu X, Hasan MS, Grant DM, Harper LT, Parsons AJ, Palmer G, Rudd CD, Ahmed I. Mechanical, degradation and cytocompatibility properties of magnesium coated phosphate glass fibre reinforced polycaprolactone composites. Journal of Biomaterials Applications 2014;29(5):675-687.
- Conejero-García Á, Gimeno HR, Sáez YM, Vilariño-Feltrer G, Ortuño-Lizarán I, Vallés-Lluch A. Correlating synthesis parameters with physicochemical properties of poly(glycerol sebacate). European Polymer Journal 2017;87:406-419.
- 11. Vallés-Lluch A, Gallego Ferrer G, Monleón Pradas M. Effect of the silica content on the physico-chemical and relaxation properties of hybrid polymer/silica nanocomposites of P(EMA-co-HEA). European Polymer Journal 2010;46(5):910-917.
- 12. Ratner BD, Weathersby PK, Hoffman AS, Kelly MA, Scharpen LH. Radiation-grafted hydrogels for biomaterial applications as studied by the ESCA technique. Journal of Applied Polymer Science 1978;22(3):643-664.
- 13. Ratner BD. Chapter I.1.5 Surface Properties and Surface Characterization of Biomaterials. Biomaterials Science (Third Edition): Academic Press; 2013. p 34-55.
- 14. Lee JJ, Yu HS, Hong SJ, Jeong I, Jang JH, Kim HW. Nanofibrous membrane of collagen-polycaprolactone for cell growth and tissue regeneration. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2009;20(9):1927-1935.



- 15. Fu W, Liu Z, Feng B, Hu R, He X, Wang H, Yin M, Huang H, Zhang H, Wang W. Electrospun gelatin/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering. International Journal of Nanomedicine 2014;9(1):2335-2344.
- 16. Suntornnond R, An J, Chua CK. Effect of gas plasma on polycaprolactone (PCL) membrane wettability and collagen type i immobilized for enhancing cell proliferation. Materials Letters 2016;171:293-296.
- Moraczewski K, Stepczyńska M, Malinowski R, Rytlewski P, Jagodziński B, 17. Zenkiewicz M. Stability studies of plasma modification effects of polylactide and polycaprolactone surface layers. Applied Surface Science 2016;377:228-237.
- 18. Pushpamalar V, Langford SJ, Ahmad M, Lim YY. Optimization of reaction conditions for preparing carboxymethyl cellulose from sago waste. Carbohydrate Polymers 2006;64(2):312-318.
- 19. Díez-Pascual AM, Díez-Vicente AL. Electrospun fibers of chitosan-grafted polycaprolactone/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) blends. Journal of Materials Chemistry B 2016;4(4):600-612.
- 20. Elzein T, Nasser-Eddine M, Delaite C, Bistac S, Dumas P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. Journal of Colloid and Interface Science 2004;273(2):381-387.
- Senedese ALC, Filho ALL, Lopes da Silva JV, Neto PI, Sena Pereira F, Filho RM. 21. Additive manufacturing to build polycaprolactone scaffolds. 2011; Brazil.
- 22. Murphy SH, Leeke GA, Jenkins MJ. A Comparison of the use of FTIR spectroscopy with DSC in the characterisation of melting and crystallisation in polycaprolactone. Journal of Thermal **Analysis** and Calorimetry 2012;107(2):669-674.
- 23. Honma T, Senda T, Inoue Y. Thermal properties and crystallization behaviour of blends of poly(ε-caprolactone) with chitin and chitosan. Polymer International 2003;52(12):1839-1846.
- 24. Phillipson K. Ageing and crystallisation of polycaprolactone. United Kingdom: University of Birmingham; 2014.
- 25. Chiu SM, Xue LY, Friedman LR, Oleinick NL. Comparison of DNA-Protein Cross-Links Induced by 4'-(9-Acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide and by y-Radiation. Cancer Research 1989;49(4):910-914.
- 26. Chen S, Guo Y, Liu R, Wu S, Fang J, Huang B, Li Z, Chen Z. Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2018;164:58-69.
- 27. Chuenjitkuntaworn B, Inrung W, Damrongsri D, Mekaapiruk K, Supaphol P, Polycaprolactone/hydroxyapatite composite Pavasant Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. Journal of Biomedical Materials Research - Part A 2010;94(1):241-251.
- 28. Gómez-Lizárraga KK, Flores-Morales C, Del Prado-Audelo ML, Álvarez-Pérez MA, Piña-Barba MC, Escobedo C. Polycaprolactone- and polycaprolactone/ceramicbased 3D-bioplotted porous scaffolds for bone regeneration: A comparative study. Materials Science and Engineering: C 2017;79(Supplement C):326-335.



- 29. Olubamiji AD, Izadifar Z, Si JL, Cooper DML, Eames BF, Chen DXB. Modulating mechanical behaviour of 3D-printed cartilage-mimetic PCL scaffolds: Influence of molecular weight and pore geometry. Biofabrication 2016;8(2).
- 30. Fayyazbakhsh F, Solati-Hashjin M, Keshtkar A, Shokrgozar MA, Dehghan MM, Larijani B. Novel layered double hydroxides-hydroxyapatite/gelatin bone tissue engineering scaffolds: Fabrication, characterization, and in vivo study. Materials Science and Engineering: C 2017;76:701-714.
- 31. Leong KF, Chua CK, Sudarmadji N, Yeong WY. Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 2008;1(2):140-152.
- 32. Fernández Á, Muniesa M, González J. Characterisation and processing of reinforced PA 6 with Halloysite nanotubes (HNT) for injection molding. Journal of Mechanical Engineering 2012;59(3):183-192.



## 5.8. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la carboximetilcelulosa de sodio 149
Figura 2. Curvas de termogravimetría dinámicas de policaprolactona, carboximetilcelulosa y sus combinaciones.
Figura 3. Correlación de pérdida de peso a 150°C (evaluada mediante TGA) y la cantidad de carboximetilcelulosa introducida en la matriz de policaprolactona 157
Figura 4. Absorción de PBS para la policaprolactona y sus composites para 1h, 2h, 24h y 48h de inmersión (*p<0,05; **p<0,01 comparado con el grupo equivalente de muestras de policaprolactona)
Figura 5. Absorción de agua para la policaprolactona y sus composites para 1h, 2h, 24h y 48h de inmersión (*p<0,05; **p<0,01 comparado con el grupo equivalente de muestras de policaprolactona)
Figura 6. Valores del ángulo de contacto en las muestras prehumedecidas 160
Figura 7. Fotografías al microscopio óptico de la distribución de partículas de carboximetil celulosa (PCL, PCL:CMC 98:2, PCL:CMC 95:5; PCL:CMC 90:10 y PCL:CMC 80:20). Escala: 1 mm
Figura 8. Comparativa de fotografías al microscopio óptico de la distribución de partículas de carboximetil celulosa (10% p/p) (izquierda) y celulosa microcristalina (10% p/p) (derecha). Escala: 1mm
Figura 9. Espectro infrarrojo de la policaprolactona y la carboximetilcelulosa 163
Figura 10. Espectro infrarrojo de los composites policaprolactona:carboximetilcelulosa
Figura 11. Número de células a lo largo del cultivo de fibroblastos en muestras de PCL y PCL:CMC tras 1, 2 y 4 días
Figura 12. Detalle de filamento obtenido durante la limpieza de la impresora tridimensional
Figura 13. Imágenes al microscopio electrónico PCL:CMC 98:2 y PCL:CMC 95:5. (Escala: 1 mm)
Figura 14. Imagen obtenida mediante microCT de pieza PCL:CMC 98:2 (Barra de escala: 1mm)
Figura 15. Imagen obtenida mediante microCT de pieza PCL:CMC 95:5 (Barra de escala: 1mm)
Figura 16. Porcentaje de absorción de PBS para policaprolactona y sus composites con carboximetilcelulosa
Figura 17. Tubos de ensayo que contienen las muestras durante la realización del cultivo celular.
Figura 18. Resultados del ensayo de viabilidad celular para las muestras impresas de policaprolactona y la combinación que contiene un 2% de carboximetilcelulosa (*



## 5.9. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores del factor de corrección de Rabinowitsch-Mooney para cada una de las combinaciones de materiales con base policaprolactona-carboximetilcelulosa y temperaturas evaluadas
Tabla 2. Valores de los parámetros de ajuste y regresión de las ecuaciones potenciales de las isotermas evaluadas para la policaprolactona y los composites basados en mezclas PCL:CMC
Tabla 3. Comparativa de la variación de los valores del índice de consistencia para los diferentes materiales composite evaluados con respecto a la policaprolactona sin aditivo
Tabla 4. Valores de los parámetros de ajuste y regresión de las ecuaciones potenciales de las isotermas evaluadas para la policaprolactona y los composites basados en mezclas PCL:CMC
Tabla 5. Valores de los parámetros de ajuste de la policaprolactona y sus combinaciones con carboximetilcelulosa para el modelo de segundo orden 153
Tabla 6. Valores de los parámetros de ajuste de la policaprolactona y sus combinaciones con carboximetilcelulosa para el modelo de segundo orden (Continuación)
Tabla 7. Coeficientes de correlación de cada modelo para las diferentes combinaciones de policaprolactona-celulosa microcristalina evaluadas
Tabla 8. Valores de temperatura de máxima degradación, temperatura de fusión y entalpía de fusión de la policaprolactona, la carboximetilcelulosa y sus combinaciones.
Tabla 9. Valores del ángulo de contacto en muestras secas y prehumedecidas (*p<0,05; **p<0,01 tomando como referencia los valores del PCL puro)
Tabla 10. Relación de áreas de los picos FTIR ( $CH_2$ en fase amorfa/ $C$ -O-C en fase cristalina)
Tabla 11. Resultados ensayos de tracción láminas obtenidas por compresión de policaprolactona y composites policaprolactona:carboximetilcelulosa (*p<0,05) 165
Tabla 12. Valores de densidad de la policaprolactona y combinaciones con carboximetilcelulosa (*p<0,05 comparado con los datos correspondientes a la PCL pura)
Tabla 13. Datos de porsosidad de piezas impresas de policaprolactona y sus combinaciones con carboximetilcelulosa (* p<0,05; ** p<0,01, ***p<0,001 tomando como referencia el conjunto de datos de la PCL pura)
Tabla 14. Parámetros mecánicos a compresión para las combinaciones de policaprolactona- carboximetilcelulosa evaluadas
Tabla 15. Parámetros mecánicos a flexión para las combinaciones de policaprolactona: carboximetil celulosa evaluadas



Capítulo 6. Evaluación de tratamientos superficiales. Recubrimiento con aloe vera.

# CONTENIDO

6.1. Introducción
6.2. Caracterización del extracto de aloe vera
6.2.1. Liofilización del extracto para su caracterización
6.2.2. Termogravimetría
6.2.3. Espectroscopía infrarroja
6.3. Caracterización de recubrimientos de aloe vera sobre láminas obtenidas mediante moldeo por compresión
6.3.1. Espectroscopía infrarroja
6.3.2. Ensayo de la toluidina
6.3.3. Ángulo de contacto
6.3.3. Ensayos biológicos
6.4. Caracterización de las estructuras tridimensionales recubiertas con aloe vera 194
6.4.1. Observación microscópica
6.4.2. Cuantificación gravimétrica de la eficiencia del procedimiento de recubrimiento
6.4.3. Análisis elemental por energía dispersiva de rayos X (EDX)
6.4.4. Ensayos biológicos
6.5. Conclusiones
6.7. Referencias
6.8. Índice de figuras
6.9. Índice de tablas

#### 6.1. INTRODUCCIÓN

En los capítulos 4 y 5 se ha descrito y evaluado la utilización de *composites* basados en la introducción de carboximetilcelulosa y celulosa microcristalina en matriz de policaprolactona. La formulación de estos composites ha tenido como objetivo mejorar las propiedades de estructuras tridimensionales obtenidas mediante fabricación aditiva de base policaprolactona, especialmente en términos de hidrofilicidad, afinidad celular y propiedades mecánicas.

Otra alternativa ampliamente analizada en el estado del arte es el empleo de tratamientos superficiales, especialmente el tratamiento con plasma. Durante el tratamiento con plasma de superficies de policaprolactona se generan grupos carboxilo.<sup>1,2</sup> Los grupos carboxilo y amino son puntos de anclaje para las proteínas extracelulares.<sup>3</sup> La adhesión de este tipo de proteínas (principalmente vitronectina, fibronectina y colágeno) sobre la superficie del material soporte es la primera fase del proceso de anclaje de osteoblastos<sup>4</sup> sobre estructuras utilizadas en regeneración ósea. Sin embargo, en la estructura de la policaprolactona sin tratar no están presentes estos grupos funcionales. Este hecho, unido a su hidrofobicidad justifica la escasa afinidad celular de este material, a pesar de su biocompatibilidad y su biodegradabilidad.

Por esta razón, los tratamientos que introduzcan grupos amino o carboxilo sobre la superficie del material conseguirán mejorar la adhesión de las proteínas extracelulares y, por tanto, la capacidad de las células de adherirse y proliferar sobre estructuras de material. Esta relación entre la presencia de los grupos amino y carboxilo y la afinidad celular explica la utilidad del empleo de tratamientos con plasma como estrategia para mejorar la capacidad de las estructuras de base policaprolactona de proporcionar un ambiente favorable a la osteointegración.

Además, el empleo de los tratamientos con plasma se utiliza también como forma de anclar sustancias bioactivas a la superficie a través de la interacción con los grupos funcionales que se forman. Tal como se describió en el *Capítulo 2. Revisión del estado del arte*, destaca el anclaje de colágeno y gelatina en los antecedentes encontrados en la bibliografía. <sup>5-7</sup> En el presente capítulo, se plantea una estrategia similar a las referenciadas, en la que se utiliza un tratamiento con plasma de oxígeno como forma de proporcionar una superficie con grupos carboxilos que sean capaces de anclar un recubrimiento de extracto de aloe vera.

A pesar de que existen referencias del empleo de extracto de aloe vera en la regeneración de hueso, <sup>8-11</sup> no se han encontrado trabajos previos acerca del empleo de esta sustancia natural como recubrimiento de otros biomateriales de menor actividad biológica frecuentemente empleados para la obtención de estructuras soporte en Ingeniería de Tejidos, tal es el caso de la policaprolactona.

En este documento se describen los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización realizados con las muestras de PCL recubiertas con extracto de aloe vera mediante el procedimiento descrito en el *Capítulo 3. Formulación de materiales y técnicas de caracterización* y que consiste en el pretratamiento de las superficies de PCL con plasma de oxígeno y su posterior inmersión en el extracto de aloe vera a diferentes valores de pH.



En la Tabla 1 se muestra el sistema de nomenclatura empleado para la designación de los diferentes grupos de muestras analizados. De esta forma, es posible diferenciar cinco grupos: las de policaprolactona sin tratar, las tratadas exclusivamente con plasma y las tratadas con plasma y posteriormente recubiertas con extracto de aloe vera.

Material	Nomenclatura
PCL sin tratar	PCL
PCL tratado con plasma (30 W 5 min)	Plasma
PCL recubierto con aloe vera a pH 3	PCL-AV-pH3
PCL recubierto con aloe vera a pH 4	PCL-AV-pH4
PCL recubierto con aloe vera a pH 5	PCL-AV-pH5

Tabla 1. Nomenclatura empleada para la designación de cada uno de los grupos de piezas analizados.

La caracterización llevada a cabo se presenta estructurada de la siguiente forma: en primer lugar, se describen los resultados de los ensayos realizados con el extracto de aloe vera liofilizado. Esta caracterización inicial tiene como objetivo determinar si el cambio de pH que se efectúa produce algún cambio estructural sobre los componentes contenidos en el extracto y consiste en el estudio de sus espectros en la región infrarroja así como de sus perfiles de degradación obtenidos mediante termogravimetría.

A continuación, se incluyen los resultados y conclusiones obtenidos en los ensayos realizados con piezas recubiertas con el extracto de aloe vera. Estas piezas son de dos tipos: obtenidas mediante moldeo por compresión y obtenidas mediante fabricación aditiva por extrusión de material. El empleo de dos métodos de fabricación tiene una finalidad análoga a la ya descrita en capítulos anteriores para el caso de los materiales composites: evaluar el papel de la estructura sobre el efecto de mejora del recubrimiento así como poder utilizar determinadas técnicas de caracterización (medición del ángulo de contacto y utilización de la espectroscopía infrarroja) que son difícilmente aplicables al análisis de estructuras porosas tridimensionales.

#### 6.2. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE ALOE VERA

En el *Capítulo 3. Formulación de materiales y técnicas de caracterización* se describió que el extracto de aloe vera utilizado consiste en un jugo comercial que contiene un 99% de gel de aloe vera.

Las hojas de la planta de aloe vera tienen, fundamentalmente, dos tipos de tejidos: la corteza verde exterior y el parénquima interior (o pulpa). A su vez, los componentes estructurales de la pulpa son tres: las paredes celulares, los orgánulos y un líquido viscoso: el gel del aloe vera. A nivel químico, la pared celular es un componente rico en ácido galactourónico, mientras que los orgánulos celulares lo son en galactosa y el gel, en manosa (Figura 1).



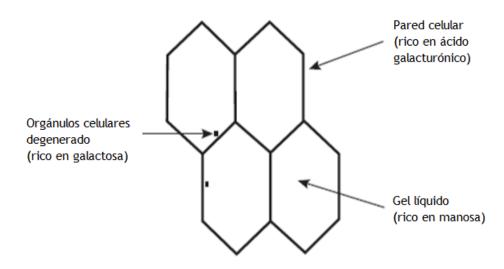


Figura 1. Representación esquemática de los componentes estructurales de la pulpa de aloe vera y su composición química. 12

El gel del aloe vera es el componente al que se le atribuyen las propiedades de coadyuvante de los procesos de regeneración descritas en el *Capítulo 2. Revisión del Estado del Arte*, debido a ser rico en polisacáridos de manosa acetilados que tienen una gran bioactividad y son solubles en agua e insolubles en etanol. Por ello, el jugo comercial ha sido centrifugado para separar la fracción fibrosa (insoluble en la matriz acuosa que es el gel) a fin de trabajar exclusivamente con los polisacáridos solubles.

El sobrenadante procedente de esta etapa de centrifugación fue utilizado para recubrir las piezas de policaprolactona. Este líquido está compuesto por diferentes polisacáridos, entre los que destaca el acemanano, si bien también se encuentran en el medio diferentes compuestos fenólicos, azúcares solubles, proteínas y minerales, 13,14 tal como se describió en mayor profundidad en el *Capítulo 2*. Las cantidades exactas de cada uno de los componentes dependerán de factores como la época del año en la que se hayan recolectado las hojas de aloe o la posición geográfica de su cultivo. 13

La diversidad y complejidad de la composición de la mezcla de componentes bioquímicos que supone el gel del aloe vera provoca que su análisis pormenorizado sea un proceso largo y fuera de los objetivos de la presente tesis doctoral. Sin embargo, sí se ha realizado una caracterización del liofilizado del gel a fin de establecer si el proceso de ajuste del pH introduce modificaciones sustanciales en la estructura química de los componentes que forman el extracto que puedan afectar posteriormente a la funcionalidad biológica de los recubrimientos. Esta caracterización ha consistido en el estudio de su espectro infrarrojo y el análisis de su descomposición térmica mediante termogravimetría.



### 6.2.1. LIOFILIZACIÓN DEL EXTRACTO PARA SU CARACTERIZACIÓN

Para poder caracterizar el extracto de aloe vera se procedió, en primer lugar, a su liofilización durante 24 horas a -50°C y 0,3 mbar en un equipo de liofilización Telstar Cryodos. En la Figura 2 se observa cómo el ajuste del pH del extracto provoca un cambio en la coloración del liofilizado, pasando de un color amarillento para los valores de pH 4 y pH 5 a una tonalidad violácea para el caso del extracto a pH 3. Este cambio en la coloración está relacionado con cambios estructurales provocados durante el proceso de modificación del pH de la suspensión.



Figura 2. Extracto de aloe liofilizado.

#### 6.2.2. TERMOGRAVIMETRÍA

La Figura 3 y la Figura 4 muestran las curvas termogravimétricas obtenidas con un ciclo dinámico con un calentamiento de 5°C/min trabajando con nitrógeno y aire respectivamente y llegando a una temperatura final de 1100°C. En ambas gráficas se comprueba la escasa estabilidad térmica del extracto de aloe vera, ya que la primera etapa degradación comienza a valores inferiores a los 50°C. Esta característica del extracto provoca que sea inviable su procesado mediante técnicas térmicas. Por consiguiente, su empleo como aditivo de manera análoga a la presentada en los capítulos anteriores para la celulosa microcristalina y la carboximetilcelulosa queda descartado.

En el termograma obtenido con los datos correspondientes al ciclo con nitrógeno es posible destacar que la única sustancia que tiene cierto contenido en cenizas (en torno al 3% en peso) es el extracto a pH 5. Esto se debe a que el hidróxido de sodio que se añade durante el proceso de ajuste del pH es capaz de formar ciertas sales estables térmicamente con los productos presentes en el extracto o con los subproductos de degradación obtenidos durante el ensayo. Sin embargo, estas sales no son estables cuando la atmósfera es reactiva (en presencia oxígeno), ya que en el ciclo realizado con aire (Figura 4) se comprueba que no hay presencia de cenizas al finalizar el ciclo.

Por último, cabe destacar que el extracto a pH 3 tiene una estabilidad térmica ligeramente superior a los extractos a pH 4 y pH 5. Este incremento puede justificarse por la formación de grupos funcionales en la estructura de los componentes del extracto con una mayor capacidad para formar interacciones intermoleculares.



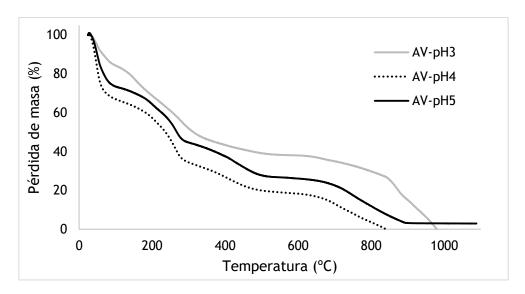


Figura 3. Curvas de termogravimetría dinámicas con nitrógeno de extractos de aloe vera a diferentes valores de pH.

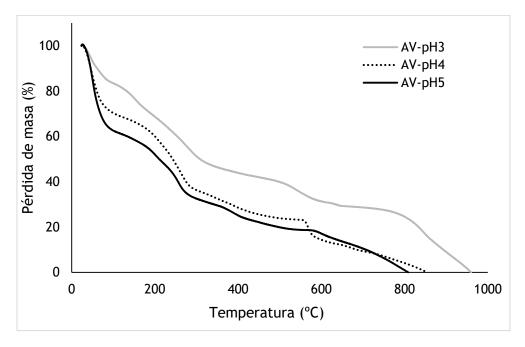


Figura 4. Curvas de termogravimetría dinámicas con aire de extractos de aloe vera a diferentes valores de pH.

### 6.2.3. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

En primer lugar, cabe destacar la complejidad de la interpretación de los espectros FTIR de forma aislada, debido a la diversidad de las sustancias presentes en los extractos de aloe vera. Por esta razón, las conclusiones obtenidas en el presente apartado deben ser confirmadas mediante el empleo de técnicas auxiliares de caracterización.

Los extractos liofilizados presentan ciertos cambios estructurales dependiendo del pH al que se ajustó el extracto previamente a su liofilización, tal como puede comprobarse en sus espectros FTIR (Figura 5). Así, es posible observar cómo la señal del carbonilo a 1730 cm<sup>-1</sup> y la señal a 1240 cm<sup>-1</sup>, que se corresponde con el estiramiento del enlace C-O del grupo acetilo, 15,16 se ven disminuidas en el espectro del extracto a



pH 5 comparado con los picos equivalentes en el espectro del extracto a pH 4. Además, el área característica de los grupos hidroxilo (3200-3300 cm<sup>-1</sup>), por su parte, se incrementa en el caso de la muestra ajustada a pH 5. Este hecho está en concordancia con la sustitución de grupos acetilo por grupos hidroxilo descrito por Salah y colaboradores.<sup>17</sup>

Por su parte, la señal en torno a 1580 cm<sup>-1</sup>, la cual Gallardo y colaboradores<sup>15</sup> relacionan con la presencia de carboxilatos, disminuye cuando el pH se acidifica a 3. Esta reducción, unida al incremento de la señal del carbonilo, sugiere la posibilidad de la transformación de dichos carboxilatos en sus correspondientes ácidos carboxílicos por la interacción con los iones hidronio añadidos al medio durante el proceso de ajuste del pH. No obstante, también es posible que el proceso de acidificación haya provocado cambios más profundos, llevándose a cabo procesos hidrolíticos sobre la estructura de los polisacáridos presentes en el extracto de aloe vera. Para confirmar qué tipo de cambios tienen lugar sería necesario llevar a cabo una caracterización química más exhaustiva que incluya, por ejemplo, la determinación del peso molecular promedio de las sustancias que constituyen la mezcla compleja que es el extracto. Este tipo de ensayo permitiría conocer si se ha producido una disminución del peso molecular como consecuencia de la escisión hidrolítica de los polisacáridos y, por tanto, confirmar o refutar esta hipótesis.

Por último, es posible mencionar que algunas señales características permanecen prácticamente constantes a los diferentes valores de pH evaluados, como es el pico situado en torno a 1030 cm<sup>-1</sup> relacionado con la presencia de glucanos. <sup>16</sup> La invariabilidad de estos picos muestra que estos componentes no se ven afectados por el cambio de pH del extracto llevado a cabo como primera etapa del proceso de recubrimiento propuesto en esta tesis doctoral.

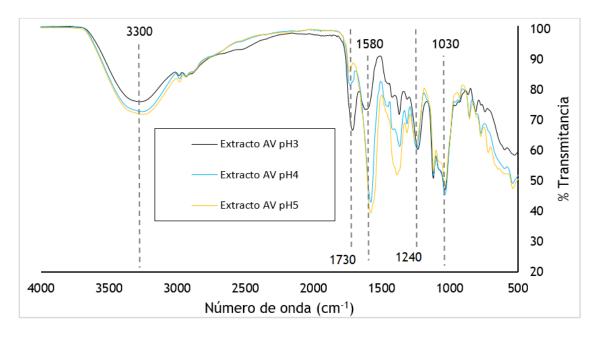


Figura 5. Espectro FTIR de los extractos de aloe vera a pH3, pH4 y pH5 tras su liofilización.



# 6.3. CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS DE ALOE VERA SOBRE LÁMINAS OBTENIDAS MEDIANTE MOLDEO POR COMPRESIÓN

En este apartado se presentan los resultados de los ensayos realizados sobre muestras de policaprolactona obtenidas mediante moldeo por compresión y posteriormente recubiertas con aloe vera de acuerdo con el procedimiento propuesto en este trabajo. Estos ensayos son: la evaluación del espectro infrarrojo, la medición del ángulo de contacto y la realización de una serie preliminar de ensayos biológicos.

#### 6.3.1. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

En la Figura 6 se presentan los espectros FTIR de la policaprolactona sin tratar, así como de muestras tratadas exclusivamente con plasma a 30W de potencia durante 5 minutos y tratadas con plasma y posteriormente recubiertas. Tal como se ha mencionado en los capítulos correspondientes al estudio de la PCL y sus composites (Capítulo 4 y Capítulo 5), las señales características del espectro infrarrojo de la policaprolactona sin tratar son los picos a 1720 cm<sup>-1</sup>, a 2946 cm<sup>-1</sup> y a 2870 cm<sup>-1</sup>. El primero de ellos se debe a la vibración de tensión del carbonilo del grupo éster<sup>18,19</sup>, mientras que los restantes, se corresponden con la tensión asimétrica del CH<sub>2</sub><sup>20</sup>.

Como puede comprobarse, en el espectro de las piezas tratadas con plasma existe una disminución de la transmitancia entre 3100 y 3300 cm<sup>-1</sup>. La aparición de este pico en superficies de PCL tratadas con plasma también ha sido referenciado por Fu y colaboradores<sup>21</sup> y se identifica con la presencia de grupos hidroxilo. Por otra parte, es posible observar la aparición de un nuevo pico a 1620 cm<sup>-1</sup>. Este pico puede ser justificado por diferentes procesos, como son la presencia de agua adsorbida<sup>22</sup> o la aparición de nuevos grupos funcionales, ya que en esa longitud de onda pueden aparecer picos correspondientes a grupos amino<sup>23</sup> o grupos carbonilo de una naturaleza química diferente a los presentes en la policaprolactona sin tratar. Los grupos carbonilo pueden presentarse a diferentes longitudes de onda en un espectro FTIR según su facilidad para formar puentes de hidrógeno. A modo de ejemplo, Riaz y Ashraf<sup>24</sup> describen cómo en las mezclas de polivinilpirrolidona con polibenzoxazina el desplazamiento del grupo carbonilo presente a 1680 cm<sup>-1</sup> en la polivinilpirrolidona hacia 1655 cm<sup>-1</sup> es un parámetro útil para determinar el grado de interacción entre ambos componentes.

La posibilidad de que las superficies de policaprolactona reaccionen tras el tratamiento con la humedad del ambiente fue descrita por Arolkar y colaboradores, <sup>25</sup> en cuya interpretación del espectro infrarrojo de muestras de PCL tratadas con plasma usando aire como gas no son capaces de identificar claramente la procedencia de las nuevas señales del espectro, que pueden deberse tanto a grupos formados durante el tratamiento por plasma como por la reacción de la superficie con la humedad ambiente. Por tanto, es necesario el empleo de técnicas de caracterización auxiliares para determinar el efecto del plasma sobre la superficie de la policaprolactona y de esta forma proponer un mecanismo por el cual se lleva a cabo el proceso de recubrimiento con el extracto de aloe vera. No obstante, de entre los grupos anteriormente mencionados, la formación de grupos amino como consecuencia de la reacción con nitrógeno es poco probable debido a que el gas empleado durante el proceso es oxígeno y en la cámara del equipo se efectúa vacío como paso previo a la



introducción de este gas. Por tanto, la concentración de nitrógeno en el ambiente reactivo será baja, reduciendo de esta forma la disponibilidad de esta sustancia para la formación de grupos amino sobre la superficie de la PCL.

Con respecto a las muestras recubiertas, cabe destacar que no se observan en los espectros de las muestras recubiertas (Figura 6) los picos de los componentes del aloe vera identificados durante la caracterización del extracto liofilizado (Figura 5). Esta observación se justifica porque el espesor del recubrimiento no es el suficiente como para permitir identificar la presencia del extracto a través del espectro FTIR, dado que esta técnica proporciona señales de la superficie de la muestra de entre 1 y 5 µm de profundidad.¹ Por tanto, aquellos recubrimientos con un espesor marcadamente inferior a este valor serán difícilmente detectables por esta técnica. Sin embargo, este hecho es útil para estimar el espesor del recubrimiento obtenido, que será inferior a este valor de penetración del haz de radiación infrarroja.

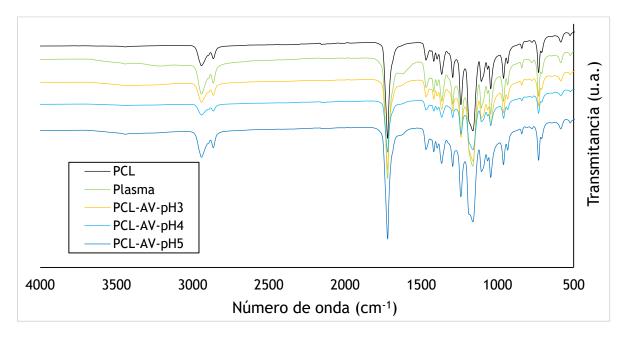


Figura 6. Espectro infrarrojo de muestras de PCL, PCL tratado con plasma, PCL tratado con plasma y recubierto con extracto de aloe vera a diferentes valores de pH.

#### 6.3.2. ENSAYO DE LA TOLUIDINA

La realización del ensayo de la toluidina descrito en el Capítulo 3, ha permitido obtener los siguientes datos: las muestras sin tratar tienen una concentración superficial de carboxilos de  $4.2\cdot10^{-4}\pm0.2\cdot10^{-4}$  µmol/cm²; mientras que las muestras tratadas con plasma de oxígeno a 30 W durante 5 minutos presentan un valor de  $2.32\cdot10^{-3}\pm0.21\cdot10^{-3}$  µmol/cm².

La presencia de una cierta cantidad de grupos carboxilo en las muestras sin tratar puede estar relacionada con la naturaleza de los grupos terminales del polímero, ya que el empleo de iniciadores que contienen grupos carboxilo es una de las opciones que pueden emplearse en la polimerización de este poliéster. <sup>26</sup>

El incremento de la concentración de grupos carboxilos superficiales supone el 452% del valor obtenido tomando como referencia las muestras sin tratar. De esta



forma, los resultados de este ensayo avalan la posibilidad de que el pico a 1620 cm<sup>-1</sup> observado en el espectro FTIR de las piezas tratadas con plasma (Figura 6) se corresponda por la aparición de grupos carboxilo, con una señal de carbonilo diferente a la presente en la estructura de la policaprolactona sin tratar, lo cual está en consonancia con las referencias bibliográficas anteriormente citadas.

#### 6.3.3. ÁNGULO DE CONTACTO

En la Tabla 2 se presentan los valores del ángulo de contacto utilizando agua y diyodometano, así como de la energía superficial de los diferentes grupos de muestras evaluadas.

Como puede comprobarse, el ángulo de contacto utilizando agua como líquido desciende de forma significativa con respecto al valor del grupo de policaprolactona (p<0,05) tanto para las muestras tratadas con plasma como para las posteriormente recubiertas con aloe.

Por su parte, debido a que el diyodometano es un componente apolar, un aumento del ángulo de contacto con este líquido implica un incremento de la concentración de grupos polares en la superficie. Para el grupo de muestras tratadas con plasma sin recubrimiento posterior, es posible observar que existe un descenso de este ángulo de contacto. Este hecho parece estar en contradicción con el descenso simultáneo del ángulo de contacto con el agua, ya que implicaría la formación simultánea de grupos hidrófilos e hidrófobos. De hecho, esta es la explicación propuesta por tendencias similares encontradas en la bibliografía. 1,27 Durante el tratamiento con plasma se genera una mezcla de múltiples especies reactivas, algunas de carácter polar y otras de carácter apolar; razón por la cual se consigue una reducción simultánea de los ángulos de contacto con líquido polar (agua) y apolar (diyodometano). En el caso de los grupos de muestras recubiertas con extracto de aloe vera, el ángulo de contacto con diyodometano se incrementa desde el valor 33,7° de la superficie tratada con plasma a 30W durante 5 minutos a valores de entre 47 y 48 $^\circ$ para las muestras recubiertas con extracto de aloe vera (47,4° para las muestras recubiertas a pH3, 48,8° para las tratadas a pH4 y 47,8° para pH5). Este incremento implica que los grupos apolares presentes en la superficie tratada con plasma que justifican el descenso del ángulo de contacto con diyodometano anteriormente mencionados no se encuentran accesibles cuando las piezas se recubren con el extracto de aloe vera. Esta observación permite obtener dos conclusiones: la primera de ellas es el hecho de que extracto tiene una estabilidad y espesor suficientes como para impedir el contacto entre el diyodometano y la superficie tratada con plasma; por su parte, la segunda conclusión relevante es la confirmación de la naturaleza polar de los compuestos anclados sobre la superficie de policaprolactona.

Las justificaciones detalladas explican también los valores de energía superficial total determinados, ya que el valor mayor se da para el caso de las muestras tratadas con plasma sin recubrir, debido a que la componente dispersiva en este grupo de muestras es superior al valor obtenido para las piezas recubiertas como consecuencia de la accesibilidad de los grupos apolares ya mencionados.



Material	Ángulo de contacto (agua)	Ángulo de contacto (diyodometano)	Energía superficial total (mN/m)	Energía superficial dispersiva (mN/m)	Energía superficial polar (mN/m)
PCL	87,1±3,8°	39,9±2,0°	39,2	35,45	3,76
Plasma	55,9±1,0°**	33,7±2,9°**	48,84	28,77	20,06
PCL-AV- pH3	55,0±1,4°**	47,4±3,9°**	42,26	24,64	22,61
PCL-AV- pH4	58,0±0° (a)	48,8±9,2°*	46,46	26,42	20,04
PCL-AV- pH5	67,6±1,5°**	47,8±4,0°**	40,60	26,91	13,69

Tabla 2. Valores del ángulo de contacto para muestras de PCL sin tratar, tratadas con plasma (30W 5 minutos) y recubiertas con aloe a diferentes valores de pH (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 con respecto al grupo de muestras de policaprolactona sin tratar). (a) se realizaron solo dos mediciones por la elevada hidrofilicidad de la muestra

Tal como se menciona en el rótulo de la Tabla 2, en el caso de las muestras recubiertas con aloe vera a pH 4 la medición del ángulo de contacto con agua fue complicada debido a la alta hidrofilicidad de las muestras, ya que el tiempo disponible para la medición de la gota era escaso debido a su deformación sobre la superficie. Para el estudio de la mojabilidad de superficies polares, los dos líquidos más empleados son el agua y el glicerol.<sup>28</sup> Por ello, se repitieron estas medidas con glicerol como líquido de estudio. La viscosidad del glicerol es 1400 veces superior a la del agua (1,4 Pa·s frente a 0,001 Pa·s),<sup>29</sup> lo que permite que la gota sea estable durante un mayor período de tiempo,<sup>30</sup> facilitando de esta forma la medición del ángulo de contacto de la superficie.

Los resultados obtenidos (Tabla 3) muestran una tendencia similar a la ya descrita para el caso del empleo de agua como líquido de trabajo, si bien en esta ocasión, el grupo de muestras recubiertas con aloe vera a pH 4 muestran unos valores más representativos, al ser posible realizar 8 mediciones.

Material	Ángulo de contacto (glicerol)
PCL	90±3,8°
Plasma	82,2±11,1°
PCL-AV-pH3	83,0±2,3°**
PCL-AV-pH4	77,9±6,7°***
PCL-AV-pH5	80,2±7,5°**

Tabla 3. Valores del ángulo de contacto para muestras de PCL sin tratar, tratadas con plasma (30W 5 minutos) y recubiertas con aloe a diferentes valores de pH utilizando glicerol como líquido de estudio (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 con respecto al grupo de muestras de policaprolactona sin tratar).



### 6.3.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS

Durante el cultivo celular sobre muestras obtenidas mediante moldeo por compresión, los valores de absorbancia obtenidos durante la evaluación de la viabilidad celular mediante el método CCK-8 fueron muy similares al control negativo (Figura 7), lo cual puede justificarse por el empleo de un insuficiente número de células durante la siembra. Sin embargo, estos resultados se incluyen en el presente documento porque aportan datos interesantes a nivel de ensayo preliminar a los resultados obtenidos para las piezas tridimensionales impresas.

En primer lugar, cabe destacar el incremento de la señal para las piezas recubiertas con aloe vera a diferentes valores de pH frente a las muestras tratadas exclusivamente con plasma. A su vez, este último grupo de muestras presenta también una absorbancia superior (relacionada con un mayor número de células viables en el cultivo) que las muestras de policaprolactona sin tratar.

Por último, en este ensayo se incluyó un grupo de muestras de material composite PCL:MCC 95:5 por ser esta combinación la que mejores resultados proporcionó en el correspondiente ensayo de viabilidad con células mesenquimales descrito en el *Capítulo 4. Evaluación de la introducción de celulosa microcristalina como aditivo*. De esta forma, se observa que, tal como cabría esperar, la señal para las muestras de PCL:MCC 95:5 es ligeramente superior a la correspondiente a la policaprolactona pura. Sin embargo, se comprueba que la señal de las piezas tratadas superficialmente es marcadamente superior, lo que confirma que los tratamientos superficiales tienen un mayor efecto sobre la afinidad celular del material que el empleo de este material composite.

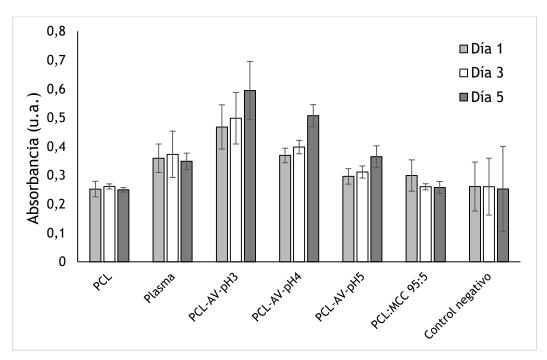


Figura 7. Valores de absorbancia del ensayo de viabilidad (CCK-8) de fibroblastos sobre estructuras de PCL sin tratar, tratadas con plasma (30W 5 minutos), recubiertas con aloe a diferentes valores de pH y muestra de material composite PCL:MCC 95:5 (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 con respecto al grupo de muestras de policaprolactona sin tratar).



# 6.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES RECUBIERTAS CON ALOE VERA

En este apartado se incluyen los resultados de los ensayos de caracterización realizados sobre piezas porosas de policaprolactona obtenidas mediante fabricación aditiva y posteriormente recubiertas con aloe vera. Estos ensayos son: su observación microscópica, la cuantificación gravimétrica de la eficiencia del proceso de recubrimiento, el análisis elemental por energía dispersiva de rayos X y los ensayos biológicos. La descripción de cómo se han llevado a cabo estas pruebas se detalla en el *Capítulo 3. Formulación de materiales y métodos de caracterización*.

#### 6.4.1. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

En la siguiente imagen (Figura 8) se muestran fotografías al microscopio electrónico de muestras con y sin recubrimiento de aloe vera. Como puede comprobarse, el recubrimiento no produce una obturación de los poros, al no tener el espesor suficiente como para modificar de forma apreciable el tamaño de poro que define la estructura.

Este punto tiene una importancia fundamental, dado que se comprueba que el recubrimiento no afecta a la interconectividad de la porosidad de la estructura. La interconectividad es una característica fundamental para asegurar la vascularización de la estructura y, por lo tanto, una mejor osteointegración de la misma.<sup>31</sup>

Por tanto, se concluye que la presencia del recubrimiento de extracto de aloe vera no afecta a la morfología de los poros de las estructuras de policaprolactona obtenidas por fabricación aditiva, manteniéndose el tamaño de poro que se diseñe así como su interconectividad, lo cual permite aprovechar una de las mayores ventajas de este tipo de técnicas de fabricación para aplicaciones de Ingeniería de Tejidos.



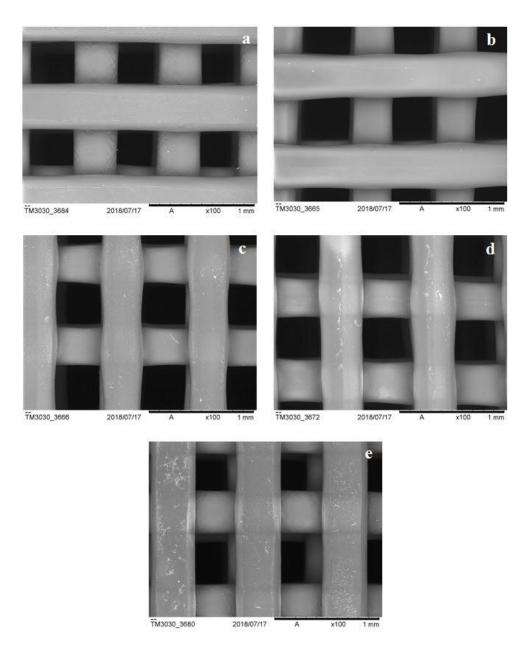


Figura 8. Imagen al microscopio de muestras de PCL sin tratar (a), PCL tratado con plasma a 30 W durante 5 minutos (b), PCL recubierto con extracto de aloe vera a pH 3 (c), PCL recubierto con extracto de aloe vera a pH 4 (d) y PCL recubierto con extracto de aloe vera a pH 5 (e). Barra de escala: 1 mm.

La observación de las superficies recubiertas con un mayor grado de detalle (Figura 9), permite comprobar que existen cúmulos de extracto sobre la superficie y que, por tanto, el recubrimiento no es totalmente homogéneo.

Por tanto, cabe esperar que la presencia de los recubrimientos afecte a la topografía de la superficie, lo que a su vez puede tener cierta influencia sobre los procesos de anclaje y colonización de la estructura por parte de las células óseas.<sup>4,32,33</sup>



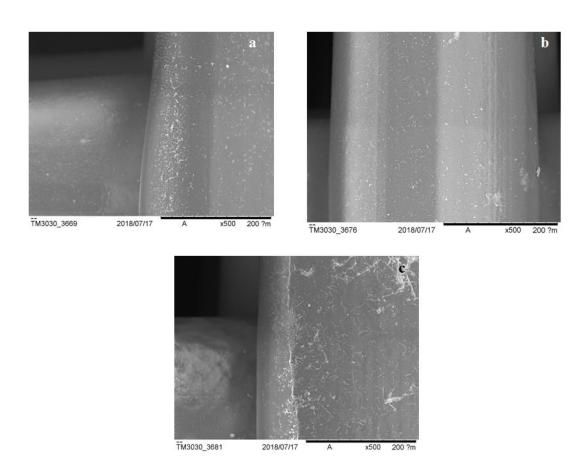


Figura 9. Imagen al microscopio de muestras PCL recubiertas con extracto de aloe vera a pH 3 (a), pH 4 (b) y pH 5 (c). Barra de escala: 200 µm.

# 6.4.2. CUANTIFICACIÓN GRAVIMÉTRICA DE LA EFICIENCIA DEL PROCEDIMIENTO DE RECUBRIMIENTO

La masa de extracto anclada sobre la superficie se ha cuantificado como la diferencia de peso de las piezas recubiertas y secas y el valor de la masa tras el tratamiento con plasma:

Masa de extracto fijado (%) = 
$$100 \cdot \frac{m_r - m_p}{m_p}$$

#### Donde:

 $m_r$  es la masa de las muestras secas tras haber sido recubiertas

 $m_p$  es la masa de las muestras tras el tratamiento con plasma

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para los diferentes grupos de muestras habiéndose empleado tres réplicas por grupo. El peso del extracto depositado se sitúa por debajo del 1%, no apreciándose diferencias significativas (p>0,05; test Kruskalwallis) entre los grupos de muestras obtenidos a valores diferentes de pH. La diferencia máxima (que se observa entre las muestras obtenidas a pH 3 y las obtenidas a pH 5) se sitúa en un 0,4%.



Material	Masa de extracto fijado (%)
PCL-AV-pH3	0,96±0,14
PCL-AV-pH4	0,95±0,47
PCL-AV-pH5	0,56±0,34

Tabla 4. Cantidad de extracto de aloe vera retenido sobre la superficie de piezas tridimensionales de PCL.

Por tanto, las diferencias que se observen en términos de funcionalidad biológica de las piezas evaluadas estarán basadas bien en los cambios estructurales del extracto evidenciados en apartados anteriores, bien en la distribución del espesor, pero no en la cantidad del mismo.

#### 6.4.3. ANÁLISIS ELEMENTAL POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (EDX)

En la Tabla 5 se muestran los valores de la relación O/C obtenidos a partir de los porcentajes de cada uno de estos elementos cuantificado a través de análisis elemental por energía dispersiva de rayos X (EDX). El valor teórico de la policaprolactona, de acuerdo con la estructura de su monómero, es de 0,33; valor cercano al determinado experimentalmente de 0,36±0,02. Este valor se incrementa ligeramente para el caso de las piezas tratadas con plasma y de manera más relevante para las piezas recubiertas con el extracto de aloe vera.

El aumento de este parámetro para las piezas tratadas con plasma se justifica teniendo en cuenta que los grupos que se generan en la superficie son grupos carboxilo, lo que supone la introducción de átomos de oxígeno en la estructura química de la capa superficial de policaprolactona.<sup>1,2</sup>

El incremento de la relación O/C a nivel superficial para las piezas recubiertas se justifica teniendo en cuenta que los componentes mayoritarios del extracto son carbohidratos, 13,34 en cuya estructura la proporción O/C es marcadamente superior a la correspondiente a la policaprolactona, debido a la presencia de gran cantidad de grupos hidroxilo presentes. De esta manera, los datos de este análisis confirman la presencia del extracto sobre la superficie de las piezas porosas.

Material	Relación O/C (at/at)	
PCL	0,36±0,02	
Plasma	0,37±0,02	
PCL-AV-pH3	0,45±0,01	
PCL-AV-pH4	0,46±0,01	
PCL-AV-pH5	0,50±0,01	

Tabla 5. Valores de la relación O/C (át/át) de las superficies de piezas impresas obtenidos mediante análisis elemental EDX.



Por otra parte, se han determinado los porcentajes de potasio y calcio presentes en las piezas recubiertas (Tabla 6). Estos elementos se sitúan por debajo del 0,5% (en masa y en composición atómica) cuando se cuantifica la composición elemental con un aumento de 100X. Sin embargo, al analizar a 2000X puntos específicos ricos en recubrimiento, si bien los valores cuantitativos continúan por debajo de ese valor, el mapa de composición elemental que se obtiene (Figura 10) muestra que los puntos ricos en recubrimiento tienen una mayor riqueza en estos elementos.

Femenia y colaboradores<sup>13</sup> muestran en su trabajo sobre la caracterización de la composición del aloe vera, que los elementos inorgánicos mayoritarios en el filete son el Ca y el K con unos valores de un 5,34% y un 1,98% en base seca. Aunque los valores exactos de las cantidades relativas de este tipo de elementos dependerán de múltiples factores, como son el tipo de suelo, el empleo de fertilizantes, etc <sup>35,36</sup> esta información bibliográfica respalda que el proceso de recubrimiento es capaz de fijar estos elementos inorgánicos sobre la superficie de la estructura.

El calcio forma parte de la hidroxiapatita, constituyente mineral del hueso. Con respecto al potasio, Wiesmann y colaboradores demostraron el papel que juega el potasio en las etapas iniciales de los procesos de biomineralización y proponen que esta influencia esté justificada bien por la activación de enzimas que intervienen en el proceso, bien por su papel de contraion de los polianiones aniónicos que constituyen la matriz extracelular.<sup>37</sup> De esta forma, la presencia de estos dos elementos en la superficie de estructuras de policaprolactona podría tener un efecto positivo sobre su biomineralización *in vivo*, si bien este aspecto debería ser analizado como continuación al trabajo que se presenta.

En cuanto a la comparativa entre los recubrimientos realizados a diferentes valores de pH, cabe destacar que el empleo de pH 5 favorece la deposición de los componentes ricos en potasio frente al calcio, tal como muestran los valores de la relación Ca/K que se presentan en la Tabla 6. Esta relación es una manera más fiable de comparar los resultados que la comparativa de los porcentajes de cada elemento de forma directa, ya que en el caso de las muestras recubiertas a pH 5, la existencia de restos de sodio procedentes del hidróxido de sodio utilizado para el ajuste hace que los valores absolutos sean un parámetro menos objetivo para realizar esta comparativa.



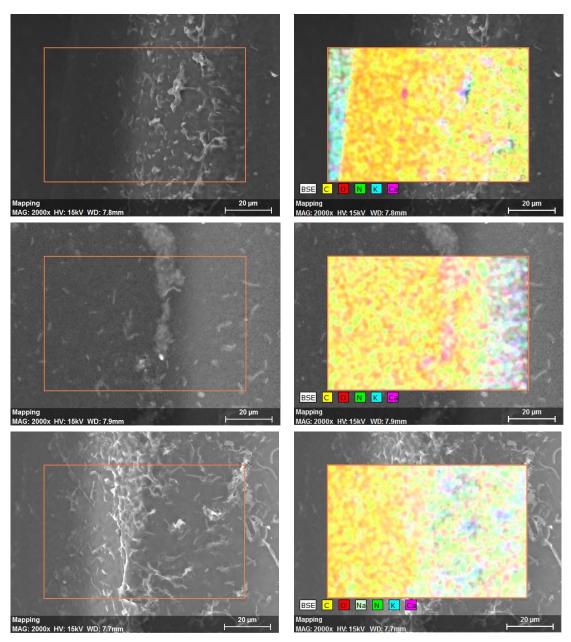


Figura 10. Mapa de composición elemental de superficies recubiertas con extracto de aloe vera a pH 3, pH 4 y pH  $_{2}$ , respectivamente. Barra de escala:  $_{2}$ 0  $_{\mu}$ m.

Material	% Ca (át)	% K (át)	Relación Ca/K (at/at)
PCL-AV-pH3	0,05±0,01	0,04±0,01	1,3±0,3
PCL-AV-pH4	0,05±0,01	0,04±0,01	1,2±0,1
PCL-AV-pH5	0,07±0,02	0,10±0,02	0,7±0,2

Tabla 6. Resultados del análisis elemental referentes al Ca y el K sobre piezas impresas recubiertas.



#### 6.4.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS

En la Figura 11 se observan los resultados del ensayo de viabilidad llevado a cabo sobre la superficie de piezas impresas sin tratar, tratadas exclusivamente con plasma y tratadas con plasma y posteriormente recubiertas con aloe vera a diferentes valores de pH.

Es posible comprobar que la introducción del aloe vera provoca un incremento significativo en la capacidad de anclaje y proliferación celular de las estructuras. La mayor hidrofilicidad de las superficies recubiertas evidenciada por la disminución en el ángulo de contacto (Tabla 2) puede jugar un papel relevante en esta diferencia.

Además, se comprueba que existe una diferencia significativa (p<0,05; test de Wilcoxon) en la absorbancia medida en el día 14 de cultivo entre las muestras recubiertas a pH 3 y las recubiertas a pH 5, siendo mayor en el primer grupo. Tal como demuestran los espectros FTIR de los extractos liofilizados (Figura 5) existen diferencias estructurales en los compuestos naturales del aloe vera según el valor de pH de la suspensión. Los datos de viabilidad muestran que estos cambios tienen un efecto en la funcionalidad biológica del recubrimiento, si bien es necesario un estudio más exhaustivo a nivel biológico para determinar qué componentes tienen un mayor efecto a la hora de justificar la mejora del anclaje y proliferación celular observada.

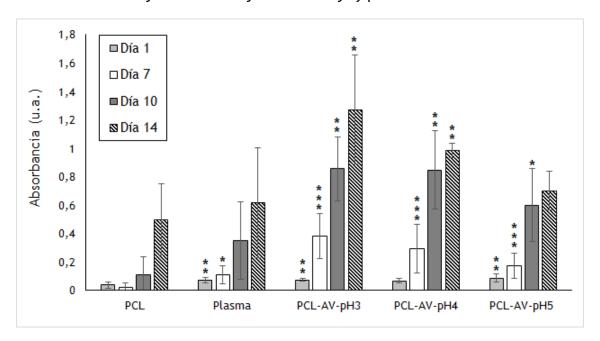


Figura 11. Valores de absorbancia del ensayo de viabilidad (CCK-8) de fibroblastos sobre estructuras de PCL sin tratar, tratadas con plasma (30W 5 minutos) y recubiertas con aloe a diferentes valores de pH (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 con respecto al grupo de muestras de policaprolactona sin tratar; test de Wilcoxon).

Por su parte, en las imágenes obtenidas mediante el protocolo de marcaje células vivas/células muertas (Figura 12) es posible corroborar los resultados obtenidos durante el ensayo de viabilidad celular. Así, es posible observar una mayor densidad de células sobre las piezas recubiertas con extracto de aloe vera que sobre las piezas tratadas con plasma pero sin recubrir. A su vez, estas últimas también proporcionan una mayor densidad de células que las estructuras de policaprolactona sin tratar.



Es posible destacar que, si bien la densidad de células es superior en las piezas recubiertas, su distribución no es totalmente homogénea a lo largo de la superficie. Esta observación está en consonancia con la distribución del recubrimiento que se muestra en la Figura 8 y confirmaría la capacidad del extracto de servir como punto de anclaje de las células.

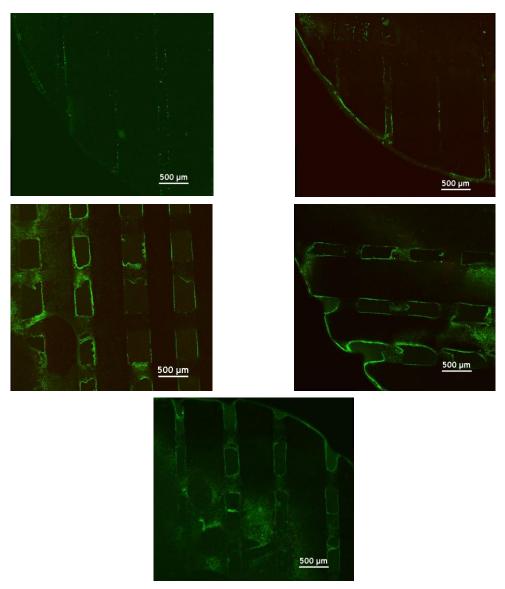


Figura 12. Imagénes del marcaje células vivas/células muestra en el día 15 de cultivo cellular (de izquierda a derecho y de arriba hacia abajo: PCL, tratamiento por plasma, recubrimiento de AV (pH3), recubrimiento de AV (pH4) recubrimiento de AV (pH5)).Barra de escala: 500 μm.



#### 6.5. CONCLUSIONES

A partir de los datos que se presentan en este capítulo es posible confirmar que el procedimiento de recubrimiento de estructuras porosas obtenidas mediante fabricación aditiva con extracto de aloe vera proporciona *scaffolds* con una mayor afinidad celular, tal como demuestran los resultados de viabilidad sobre cultivos de fibroblastos de ratón.

Además, se ha comprobado que el pH al que se encuentra el extracto de aloe vera durante el proceso de recubrimiento provoca cambios estructurales sobre los componentes que forman la mezcla compleja que es este extracto. Estos cambios a nivel químico implican, además, modificaciones en cuanto a la funcionalidad biológica del recubrimiento, ya que existen diferencias significativas en los resultados de viabilidad de los grupos de muestras recubiertas obtenidas a diferentes valores de pH.

Sin embargo, estos cambios estructurales no afectan al rendimiento del proceso de recubrimiento, ya que para todos los grupos de muestras, el incremento de la masa depositada se sitúa en valores similares, de entre el 0,7 y el 1,2% en peso.

En este punto cabe destacar la utilidad de realizar una caracterización más exhaustiva de este recubrimiento, como puede ser la medición del Ca y el K en el extracto del aloe vera mediante técnicas como la absorción atómica, así como sobre las piezas recubiertas para de esta manera cuantificar la eficacia de la retención de estos elementos durante el proceso. Además, para garantizar que estos resultados sean de aplicación en el ámbito de la Ingeniería de Tejidos es necesario llevar a cabo un estudio más exhaustivo acerca de la biofuncionalidad del mismo, como puede ser la caracterización del proceso de mineralización *in vitro* con los recubrimientos obtenidos a diferentes valores de pH.

Por otra parte, sería conveniente realizar un estudio sobre las propiedades del recubrimiento en otros aspectos de funcionalidad biológica, como la determinación de la capacidad de mejorar o acelerar la diferenciación de células pluripotenciales o el efecto antimicrobiano para la prevención de infecciones postoperatorias de este tipo de estructuras. El efecto antimicrobiano del gel de aloe vera es una propiedad ya demostrada en el Estado del Arte, <sup>17,38</sup> por lo que es probable que los recubrimientos posean también esta característica.

Por último, cabe destacar el interés de proponer como línea futura del presente trabajo la evaluación de scaffolds obtenidos mediante la utilización de los composites propuestos en esta tesis doctoral (especialmente los basados en las combinaciones policaprolactona:celulosa microcristalina) y posteriormente recubiertos con extractos de aloe vera siguiendo un procedimiento análogo al descrito en este capítulo. Esta estrategia permitiría aprovechar las ventajas relativas de las dos estrategias de mejora de las propiedades de la policaprolactona. El empleo de recubrimientos bioactivos, si bien suelen proporcionar un efecto mayor en cuanto a la mejora de la capacidad de anclaje y proliferación celular, tienen la desventaja de que las modificaciones introducidas sobre la estructura soporte desaparecen una vez el recubrimiento haya sido biodegradado *in vivo*. En este punto, el empleo de un material soporte con una mayor hidrofilicidad (como son los composites PCL:MCC) permitirían prolongar este



efecto de mejora a largo plazo. Una estrategia similar ha sido propuesta por Wang y colaboradores,<sup>39</sup> quienes emplean una estructura porosa composite mediante la aditivación de la policaprolactona con grafeno y posteriormente llevan a cabo un tratamiento superficial con sosa a fin de mejorar la hidrofilicidad de la superficie. Este estudio supone un precedente a la línea futura que se plantea para obtener estructuras optimizadas mediante la combinación de diferentes estrategias de mejora de las propiedades de la policaprolactona.



#### 6.7. REFERENCIAS

- 1. Can-Herrera LA, Ávila-Ortega A, de la Rosa-García S, Oliva AI, Cauich-Rodríguez JV, Cervantes-Uc JM. Surface modification of electrospun polycaprolactone microfibers by air plasma treatment: Effect of plasma power and treatment time. European Polymer Journal 2016;84:502-513.
- 2. Ma Z, He W, Yong T, Ramakrishna S. Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation. Tissue Engineering 2005;11(7-8):1149-1158.
- 3. Nedela O, Slepicka P, Švorcík V. Surface modification of polymer substrates for biomedical applications. Materials 2017;10(10).
- 4. Chen S, Guo Y, Liu R, Wu S, Fang J, Huang B, Li Z, Chen Z. Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2018;164:58-69.
- 5. Suntornnond R, An J, Chua CK. Effect of gas plasma on polycaprolactone (PCL) membrane wettability and collagen type i immobilized for enhancing cell proliferation. Materials Letters 2016;171:293-296.
- 6. Sousa I, Mendes A, Pereira RF, Bártolo PJ. Collagen surface modified poly(ε-caprolactone) scaffolds with improved hydrophilicity and cell adhesion properties. Materials Letters 2014;134:263-267.
- 7. Sahapaibounkit P, Prasertsung I, Mongkolnavin R, Wong CS, Damrongsakkul S. A two-step method using air plasma and carbodiimide crosslinking to enhance the biocompatibility of polycaprolactone. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials 2017;105(6):1658-1666.
- 8. Chantarawaratit P, Sangvanich P, Banlunara W, Soontornvipart K, Thunyakitpisal P. Acemannan sponges stimulate alveolar bone, cementum and periodontal ligament regeneration in a canine class II furcation defect model. Journal of Periodontal Research 2014;49(2):164-178.
- 9. Boonyagul S, Thunyakitpisal P, Tachaboonyakiat W. Physical properties and biocompatibility of acemannan scaffold for biomedical applications. 2015.
- 10. Shanmugavel S, Reddy VJ, Ramakrishna S, Lakshmi BS, Dev VG. Precipitation of hydroxyapatite on electrospun polycaprolactone/aloe vera/silk fibroin nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. Journal of Biomaterials Applications 2014;29(1):46-58.
- 11. Godoy DJD, Chokboribal J, Pauwels R, Banlunara W, Sangvanich P, Jaroenporn S, Thunyakitpisal P. Acemannan increased bone surface, bone volume, and bone density in a calvarial defect model in skeletally-mature rats. Journal of Dental Sciences 2018.
- 12. Hamman JH. Composition and applications of Aloe vera leaf gel. Molecules 2008;13(8):1599-1616.
- 13. Femenia A, Sánchez ES, Simal S, Rosselló C. Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) plant tissues. Carbohydrate Polymers 1999;39(2):109-117.



- 14. Maan AA, Nazir A, Khan MKI, Ahmad T, Zia R, Murid M, Abrar M. The therapeutic properties and applications of Aloe vera: A review. Journal of Herbal Medicine 2018;12:1-10.
- 15. Gallardo-Rivera R, de los Ángeles Aguilar-Santamaría M, Silva-Bermúdez P, García-López J, Tecante A, Velasquillo C, Román-Guerrero A, Pérez-Alonso C, Vázquez-Torres H, Shirai K. Polyelectrolyte complex of Aloe vera, chitosan, and alginate produced fibroblast and lymphocyte viabilities and migration. Carbohydrate Polymers 2018;192:84-94.
- 16. Nejatzadeh-Barandozi F, Enferadi STJOaMCL. FT-IR study of the polysaccharides isolated from the skin juice, gel juice, and flower of Aloe vera tissues affected by fertilizer treatment. 2012;2(1):33.
- 17. Salah F, Ghoul YE, Mahdhi A, Majdoub H, Jarroux N, Sakli F. Effect of the deacetylation degree on the antibacterial and antibiofilm activity of acemannan from Aloe vera. Industrial Crops and Products 2017;103:13-18.
- 18. Díez-Pascual AM, Díez-Vicente AL. Electrospun fibers of chitosan-grafted polycaprolactone/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) blends. Journal of Materials Chemistry B 2016;4(4):600-612.
- 19. Elzein T, Nasser-Eddine M, Delaite C, Bistac S, Dumas P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. Journal of Colloid and Interface Science 2004;273(2):381-387.
- 20. Senedese ALC, Filho ALL, Lopes da Silva JV, Neto PI, Sena Pereira F, Filho RM. Additive manufacturing to build polycaprolactone scaffolds. 2011; Brazil.
- 21. Fu X, Sammons RL, Bertóti I, Jenkins MJ, Dong H. Active screen plasma surface modification of polycaprolactone to improve cell attachment. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials 2012;100 B(2):314-320.
- 22. Liu Y, Kim HJ. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and simple algorithm analysis for rapid and non-destructive assessment of developmental cotton fibers. Sensors (Switzerland) 2017;17(7).
- 23. Malviya T, Joshi S, Dwivedi LM, Baranwal K, Shehala, Pandey AK, Singh V. Synthesis of Aloevera/Acrylonitrile based Nanoparticles for targeted drug delivery of 5-Aminosalicylic acid. International Journal of Biological Macromolecules 2018;106:930-939.
- 24. Riaz U, Ashraf SM. Characterization of polymer blends with FTIR spectroscopy. In: Thomas S, Grohens Y, Jyotishkumar P, editors. Characterization of polymer blends: miscibility, morphology and interfaces: Wiley; 2015.
- 25. Arolkar GA, Salgo MJ, Kelkar-Mane V, Deshmukh RR. The study of air-plasma treatment on corn starch/poly(ε-caprolactone) films. Polymer Degradation and Stability 2015;120:262-272.
- 26. Orozco-Castellanos LM, Marcos-Fernández A, Martínez-Richa A. Hydrolytic degradation of poly(ε-caprolactone) with different end groups and poly(ε-caprolactone-co-γ-butyrolactone): Characterization and kinetics of hydrocortisone delivery. Polymers for Advanced Technologies 2011;22(4):430-436.
- 27. Moraczewski K, Stepczyńska M, Malinowski R, Rytlewski P, Jagodziński B, Zenkiewicz M. Stability studies of plasma modification effects of polylactide and polycaprolactone surface layers. Applied Surface Science 2016;377:228-237.



- 28. Oss CJV, Good RJ, Busscher HJ. Estimation of the polar surface tension parameters of glycerol and formamide, for use in contact angle measurements on polar solids. Journal of Dispersion Science and Technology 1990;11(1):75-81.
- 29. Zahidi AAA, Cheong BH-P, Huynh SH, Vuong T, Liew OW, Ng TW. Glycerol-water sessile drop elongation on PTFE inclines in relation to biochemical applications. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 2015;486:21-28.
- 30. Chen L, Bonaccurso E. Effects of surface wettability and liquid viscosity on the dynamic wetting of individual drops. Physical Review E Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics 2014;90(2).
- 31. Mercado-Pagán ÁE, Stahl AM, Shanjani Y, Yang Y. Vascularization in Bone Tissue Engineering Constructs. Annals of Biomedical Engineering 2015;43(3):718-729.
- 32. Nikkhah M, Edalat F, Manoucheri S, Khademhosseini A. Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface. Biomaterials 2012;33(21):5230-5246.
- 33. Yao X, Peng R, Ding J. Cell-material interactions revealed via material techniques of surface patterning. Advanced Materials 2013;25(37):5257-5286.
- 34. Chang XL, Chen BY, Feng YM. Water-soluble polysaccharides isolated from skin juice, gel juice and flower of Aloe vera Miller. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 2011;42(2):197-203.
- 35. Miranda M, Maureira H, Rodríguez K, Vega-Gálvez A. Influence of temperature on the drying kinetics, physicochemical properties, and antioxidant capacity of Aloe Vera (Aloe Barbadensis Miller) gel. Journal of Food Engineering 2009;91(2):297-304.
- 36. García-Hernández JL, Valdez-Cepeda RD, Murillo-Amador B, Beltrán-Morales FA, Ruiz-Espinoza FH, Orona-Castillo I, Flores-Hernández A, Troyo-Diéguez E. Preliminary compositional nutrient diagnosis norms in Aloe vera L. grown on calcareous soil in an arid environment. Environmental and Experimental Botany 2006;58(1):244-252.
- 37. Wiesmann HP, Plate U, Zierold K, Höhling HJ. Potassium is involved in apatite biomineralization. Journal of Dental Research 1998;77(8):1654-1657.
- 38. Jain S, Rathod N, Nagi R, Sur J, Laheji A, Gupta N, Agrawal P, Prasad S. Antibacterial effect of aloe vera gel against oral pathogens: An in-vitro study. Journal of Clinical and Diagnostic Research 2016;10(11):ZC41-ZC44.
- 39. Wang W, Caetano G, Ambler WS, Blaker JJ, Frade MA, Mandal P, Diver C, B�rtolo P. Enhancing the hydrophilicity and cell attachment of 3D printed PCL/graphene scaffolds for bone tissue engineering. Materials 2016;9(12).



## 6.8. ÍNDICE DE FIGURAS

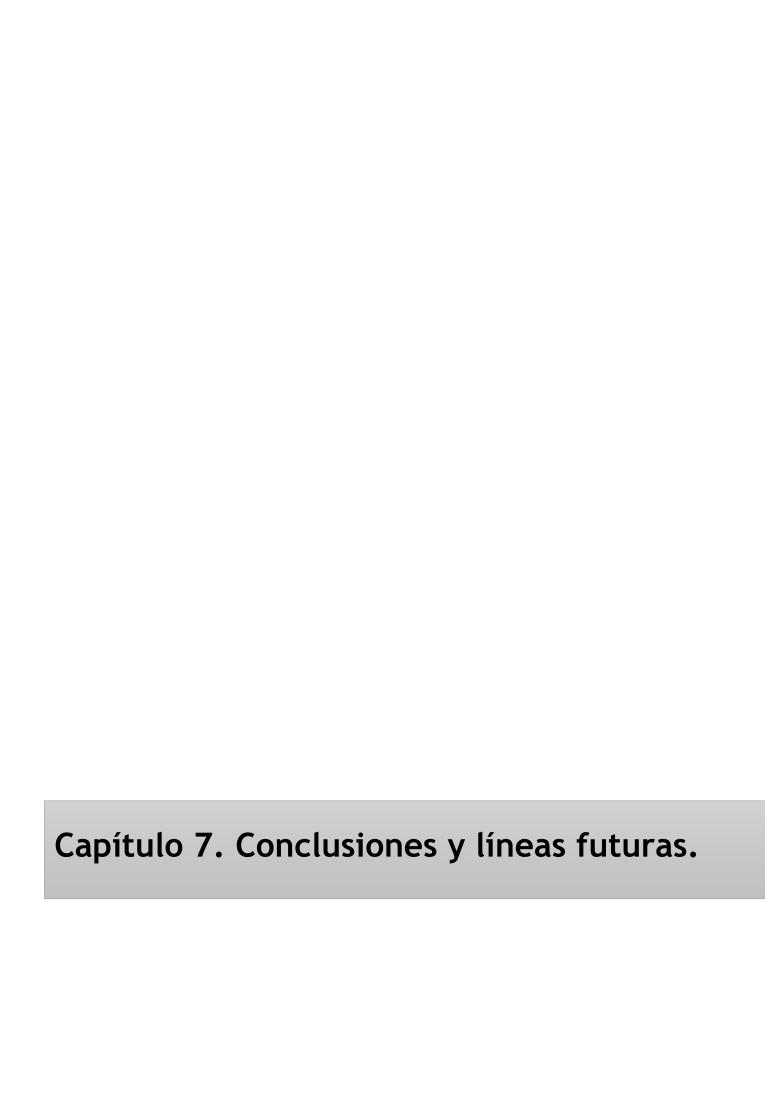
Figura 1. Representación esquemática de los componentes estructurales de la pulpa de aloe vera y su composición química. 12
Figura 2. Extracto de aloe liofilizado
Figura 3. Curvas de termogravimetría dinámicas con nitrógeno de extractos de aloevera a diferentes valores de pH
Figura 4. Curvas de termogravimetría dinámicas con aire de extractos de aloe vera a diferentes valores de pH
Figura 5. Espectro FTIR de los extractos de aloe vera a pH3, pH4 y pH5 tras su liofilización
Figura 6. Espectro infrarrojo de muestras de PCL, PCL tratado con plasma, PCL tratado con plasma y recubierto con extracto de aloe vera a diferentes valores de pH 190
Figura 7. Valores de absorbancia del ensayo de viabilidad (CCK-8) de fibroblastos sobre estructuras de PCL sin tratar, tratadas con plasma (30W 5 minutos), recubiertas cor aloe a diferentes valores de pH y muestra de material <i>composite</i> PCL:MCC 95:5 (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 con respecto al grupo de muestras de policaprolactona sin tratar).
Figura 8. Imagen al microscopio de muestras de PCL sin tratar (a), PCL tratado cor plasma a 30 W durante 5 minutos (b), PCL recubierto con extracto de aloe vera a pH 3 (c), PCL recubierto con extracto de aloe vera a pH 4 (d) y PCL recubierto con extracto de aloe vera a pH 5 (e). Barra de escala: 1 mm
Figura 9. Imagen al microscopio de muestras PCL recubiertas con extracto de aloe vera a pH 3 (a), pH 4 (b) y pH 5 (c). Barra de escala: 200 $\mu$ m
Figura 10. Mapa de composición elemental de superficies recubiertas con extracto de aloe vera a pH 3, pH 4 y pH 5, respectivamente. Barra de escala: 20 µm 199
Figura 11. Valores de absorbancia del ensayo de viabilidad (CCK-8) de fibroblastos sobre estructuras de PCL sin tratar, tratadas con plasma (30W 5 minutos) y recubiertas con aloe a diferentes valores de pH (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 con respecto a grupo de muestras de policaprolactona sin tratar; test de Wilcoxon)
Figura 12. Imagénes del marcaje células vivas/células muestra en el día 15 de cultivo cellular (de izquierda a derecho y de arriba hacia abajo: PCL, tratamiento por plasma recubrimiento de AV (pH3), recubrimiento de AV (pH4) recubrimiento de AV (pH5)).Barra de escala: 500 µm



#### 6.9. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura empleada para la designación de cada uno de los grupos de piezas analizados
Tabla 2. Valores del ángulo de contacto para muestras de PCL sin tratar, tratadas con plasma (30W 5 minutos) y recubiertas con aloe a diferentes valores de pH (*p<0,05 **p<0,01; ***p<0,001 con respecto al grupo de muestras de policaprolactona sin tratar) (a) se realizaron solo dos mediciones por la elevada hidrofilicidad de la muestra 1920
Tabla 3. Valores del ángulo de contacto para muestras de PCL sin tratar, tratadas con plasma (30W 5 minutos) y recubiertas con aloe a diferentes valores de pH utilizando glicerol como líquido de estudio (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 con respecto al grupo de muestras de policaprolactona sin tratar)
Tabla 4. Cantidad de extracto de aloe vera retenido sobre la superficie de pieza tridimensionales de PCL
Tabla 5. Valores de la relación O/C (át/át) de las superficies de piezas impresa obtenidos mediante análisis elemental EDX
Tabla 6. Resultados del análisis elemental referentes al Ca y el K sobre piezas impresa





#### CONTENIDO

7.1. Conclusiones	209
7.1.1. Composites de base policaprolactona	209
7.1.2. Recubrimiento con extracto de aloe vera	210
7.2. Líneas futuras	211
7.1. Conclusions	213
7.1.1. Polycaprolactone-based composites	213
7.1.2. Aloe vera extract coating	214
7.2. Future research lines	215

En este capítulo se exponen las principales conclusiones que ha sido posible extraer a partir de los datos obtenidos durante el desarrollo experimental de la presente tesis doctoral, los cuales se han detallado en los capítulos previos. A la vista de estas conclusiones, se propone una serie de líneas futuras de investigación que puedan resultar interesantes para proporcionar nuevas estrategias de mejora de las estructuras de policaprolactona como soporte para la regeneración ósea.

#### 7.1. CONCLUSIONES

Siguiendo la estructura llevada a cabo en la presente tesis doctoral, se presentan de forma diferenciada las conclusiones relacionadas con la evaluación de los composites de base policaprolactona obtenidos mediante aditivación con celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa y las planteadas tras el análisis de los resultados de la evaluación del efecto de los recubrimientos con extracto de aloe vera.

#### 7.1.1. COMPOSITES DE BASE POLICAPROLACTONA

- Es posible obtener estructuras porosas tridimensionales con porosidad definida e interconectada mediante fabricación aditiva empleando los materiales composites propuestos en esta tesis doctoral (policaprolactona:celulosa microcristalina y policaprolactona:carboximetilcelulosa).
- ➤ Las combinaciones basadas en mezclas de policaprolactona:celulosa microcristalina tienen una mejor procesabilidad que las basadas en policaprolactona:carboximetilcelulosa para su empleo como materia prima de procesos de fabricación aditiva mediante extrusión térmica alimentados con hilo. Por esta razón, la cantidad máxima de aditivo que ha sido posible incluir para el procesado de los composites mediante estas técnicas fue de un 10% (p/p) en el caso de la celulosa microcristalina y un 5% (p/p) en el caso de la carboximetilcelulosa.
- La hidrofilicidad de las formulaciones basadas en la aditivación de la matriz de policaprolactona con carboximetilcelulosa es superior a la correspondiente a los composites obtenidos al emplear la celulosa microcristalina como aditivo, tal como reflejan los datos de absorción de agua y PBS.
- > Los ensayos de viabilidad llevados a cabo muestran que las combinaciones policaprolactona:celulosa microcristalina tienen un mayor potencial para mejorar la afinidad celular de las estructuras de base policaprolactona.
- La relación entre la mejora de la afinidad biológica y la concentración de aditivo introducido no es lineal, ya que las muestras con bajas concentraciones de aditivo presentan unos resultados más favorables que las que contienen una mayor cantidad.

ULPGC

- La celulosa microcristalina tiene un efecto de refuerzo sobre la matriz de policaprolactona como consecuencia del incremento de la cristalinidad de la misma. Este efecto se explica por la capacidad de las partículas de actuar como puntos de nucleación durante el proceso de cristalización, tal como demuestran los espectros FTIR de las diferentes combinaciones analizadas, así como la evaluación de sus propiedades térmicas y su patrón de difracción de rayos X.
- El incremento de la rigidez de las estructuras no es proporcional a la cantidad de aditivo presente en las formulaciones, debido a dos causas: la aparición de microporos en los filamentos que componen la estructura de las piezas porque a concentraciones elevadas se dificulta la adecuada deposición de los mismos y la disminución del efecto de nucleación responsable del incremento de la cristalinidad como consecuencia de la aglomeración de las partículas.
- ➤ El módulo de elasticidad a compresión de las estructuras tridimensionales PCL:MCC 98:2 y PCL:MCC 95:5 se sitúan en el rango referenciado para el hueso trabecular, por lo que estos *scaffolds* son susceptibles de ser empleados para la regeneración de este tipo de tejido.
- ➤ El efecto de refuerzo no se aprecia para las estructuras tridimensionales porosas obtenidas con los composites PCL:CMC, a pesar de que en las láminas de estos materiales sí existe un incremento del módulo de elasticidad a tracción. Esta observación se justifica por la peor procesabilidad de estas combinaciones, lo que da lugar a la aparición a un mayor número de microporos en los filamentos. Estos microporos disminuyen la adhesión entre capas en las estructuras impresas y, por tanto, las propiedades mecánicas de la estructura. Además, el incremento de la cristalinidad en estos composites es inferior que en el caso de los obtenidos a partir de las combinaciones PCL:MCC, tal como evidencian los datos calorimétricos, de espectroscopía infrarroja y de densidad obtenidos en este trabajo.

#### 7.1.2. RECUBRIMIENTO CON EXTRACTO DE ALOE VERA

- ➤ El empleo de un pretratamiento con plasma de oxígeno a 30 W de potencia durante 5 minutos y posterior recubrimiento con extracto de aloe vera es un procedimiento adecuado para la obtención de estructuras porosas de policaprolactona con una mayor afinidad biológica que las estructuras sin recubrir o tratadas exclusivamente con plasma.
- ➤ Dado que el tratamiento con plasma es la modificación superficial más extendida en el Estado del Arte para favorecer el anclaje y proliferación celulares sobre superficies de biomateriales de limitada hidrofilicidad (tal es el caso de la policaprolactona), el hecho de que el recubrimiento de aloe



proporcione unos mejores resultados en términos de viabilidad celular en cultivos de fibroblastos permite establecer el potencial de esta alternativa para la mejora de las propiedades de las estructuras de policaprolactona.

- ➤ La caracterización química de los extractos ha evidenciado que existen modificaciones estructurales del extracto en suspensión utilizado durante el proceso de recubrimiento como consecuencia del cambio de pH.
- Esas diferencias estructurales conllevan modificaciones en la funcionalidad biológica, obteniéndose los mejores resultados de viabilidad celular para las muestras recubiertas a pH 3.

#### 7.2. LÍNEAS FUTURAS

A partir de los resultados que se presentan en este trabajo, se ha podido determinar que la introducción de celulosa microcristalina en matriz de policaprolactona permite obtener un material composite con propiedades mejoradas a la policaprolactona pura en términos de afinidad biológica y rigidez mecánica.

Esta estrategia podría probarse con otros biomateriales que presentan propiedades y limitaciones de aplicación similares a las de la policaprolactona, como es el caso del ácido poliláctico.

Asimismo, a pesar de los resultados favorables que se han obtenido en la presente tesis doctoral, se han observado deficiencias en el proceso de fabricación que podrían solventarse mediante una mejor dispersión del aditivo en la matriz mediante la modificación de la etapa de formulación del material composite. Las mejoras en este sentido podrían posibilitar incrementar la cantidad de aditivo presente en la estructura y, probablemente, conseguir una mayor extensión de las mejoras conseguidas.

La realización de un seguimiento de la evolución de las propiedades de las estructuras fabricadas con los materiales composites propuestos en este trabajo conforme se produce la degradación *in vitro* es un estudio complementario que permitiría establecer su idoneidad para las aplicaciones de regeneración de hueso antes de llevar a cabo las siguientes fases de prueba de cualquier material susceptible de ser empleado en el campo biomédico (estudios *in vivo*). En este sentido, es especialmente interesante cuantificar cómo varían las propiedades mecánicas conforme se genera la matriz extracelular en un cultivo *in vitro*.

Por otra parte, sería de gran utilidad la realización de una caracterización biológica más profunda a fin de determinar el mecanismo por el cual los aditivos celulósicos mejoran la capacidad de las células para anclarse sobre la superficie del material.



Con respecto a los recubrimientos de aloe vera, la realización de una caracterización química más exhaustiva podría proporcionar información interesante para determinar qué componentes del extracto tienen un mayor impacto sobre el incremento de la afinidad biológica que se ha demostrado en este trabajo.

Por último, dadas las ventajas complementarias que ofrecen la formulación de composites y el empleo de recubrimientos de extracto de aloe vera, la utilización conjunta de ambas estrategias es una línea de trabajo que puede proporcionar scaffolds con propiedades marcadamente mejoradas frente a la utilización de la policaprolactona pura.

In this chapter the main conclusions extracted from the experimental data obtained during this PhD thesis are described. From these conclusions, it is possible to propose future research lines which could be interesting to provide innovative strategies to improve the polycaprolactone-based scaffolds to be used for Bone Tissue Engineering.

#### 7.1. CONCLUSIONS

Following the structure of the entire document, the conclusions related to the evaluation of composite scaffolds obtained by filling polycaprolactone (PCL) with microcrystalline cellulose (MCC) and carboxymethylcellulose (CMC) and the conclusions related to the analysis of the aloe vera extract coating are presented in separate sections below.

#### 7.1.1. POLYCAPROLACTONE-BASED COMPOSITES

- ➤ It is possible to obtain three-dimensional porous structures with a defined and interconnected porosity by additive manufacturing using the composite materials proposed in this PhD thesis (PCL:MCC and PCL:CMC) as feedstock.
- > The combinations based on polycaprolactone:microcrystalline cellulose blends better processability than those polycaprolactone:carboxymethylcellulose for their utilization as feedstock for extrusion based additive manufacturing techniques fed by filament. For this reason, the maximum amount of additive introduced in the matrix was 10% (wt/wt) for microcrystalline cellulose and 5% (wt/wt) for carboxymethylcellulose.
- ➤ The hydrophilicity of the formulations based on the introduction of carboxymethylcellulose in the polycaprolactone matrix is higher than the hydrophilicity of polycaprolactone:microcrystalline cellulose composites. This conclusion is evidenced by the water and PBS uptake values.
- > The cell viability assays show that polycaprolactone:microcrystalline cellulose combinations have a higher potential to improve cell affinity of polycaprolactone-based structures.
- ➤ The relationship between cell affinity and the additive concentration is not linear, as the samples containing low additive concentration show more favourable results than those containing high concentration values.
- Microcrystalline cellulose has a reinforcement effect on the polycaprolactone matrix due to the increment of the crystallinity. This effect is explained by the ability of the particles to act as nucleating points during the crystallization process, as shown by the FTIR spectra of the different



combinations of materials, the evaluation of their thermal behaviour and their X-Ray diffraction patterns.

- The increase in the stiffness of the structures is not proportional to the amount of additive filled in the matrix, because of two reasons: the formation of micropores in the filaments that define the structure of the parts since high additive concentration values hinder the deposition process and the decrease in the nucleating effect responsible for the increase in crystallinity as a consequence of the particle agglomeration.
- > The PCL:MCC 98:2 and PCL:MCC 95:5 structures have a compressive modulus in the range of trabecular bone. Therefore, these scaffolds could be used in the regeneration of this type of tissue.
- The PCL:CMC composite porous structures do not show any reinforcement effect, although there is an increase in the stiffness of the bulk material compared to pure polycaprolactone. This trend can be explained by the lower processability of these combinations. During deposition, more micropores are created on the filaments because of this lack of suitable processability. These micropores decrease the layer to layer adhesion and, as a consequence, the mechanical behaviour of the structures is reduced. Besides, the increase in crystallinity is lower in this case than for PCL:MCC composites. This conclusion has been obtained by the observation of calorimetric data, infrared spectra and density values.

#### 7.1.2. ALOE VERA EXTRACT COATING

- ➤ The process that has been proposed in this PhD thesis to obtain 3D printed porous polycaprolactone structures with an aloe vera extract coating consists of the following steps: treatment with low pressure oxygen plasma at 30 W for 5 minutes and immersion in aloe vera extract. The samples prepared with this procedure provide an improvement in cell affinity compared to untreated PCL samples or plasma treated ones.
- ▶ Plasma treatment is the most explored surface modification in the State of the Art to increase the cell affinity of different biomaterials with limited hydrophilicity (such as PCL). Therefore, the improvement of the cell viability results of the coated samples compared to plasma treated ones is a definite evidence of the potential of the coatings to improve the properties of the polycaprolactone-based structures.
- > The aloe vera extract chemical characterization shows that there are structural modifications of the suspensions used during the immersion stage of the coating process as a consequence of the pH adjustment.



> These structural differences imply modifications in the biological functionality of the coated samples. The best cell viability results are observed for the samples coated at pH 3.

#### 7.2. FUTURE RESEARCH LINES

From the results presented in this work, it has been possible to conclude that the introduction of microcrystalline cellulose in the polycaprolactone matrix allows to obtain a composite material with improved properties compared to pure polycaprolactone in terms of cell affinity and mechanical stiffness.

This strategy of using cellulosic derivates as additives to obtain composite materials to be used in Tissue Engineering applications could be tested for other matrices with demonstrated biocompatibility but limitations due to hydrophobicity, such as polylactic acid.

In spite of the positive results obtained with the composite structures, some difficulties in the manufacturing process have been observed. These difficulties could be overcome by improving the dispersion of the additive in the matrix with some modifications of the compounding stage. Improvements at this stage would allow to increase the concentration of the additive in the structure and, probably, to obtain a greater extension of the modifications of the properties of the matrix.

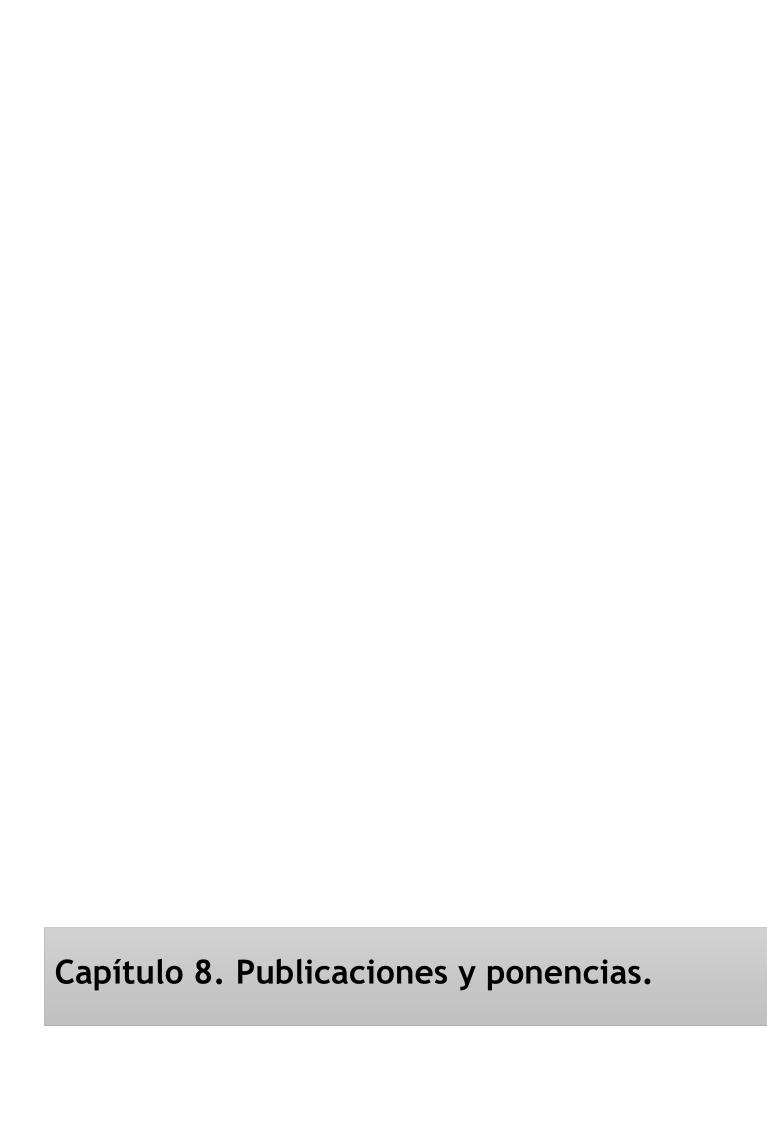
A complementary assessment that could provide useful results before going through the next phase of the biological evaluation of the structures (*in vivo* analysis) could be the analysis of the properties of the material while it is degraded *in vitro*. In this set of tests, the mechanical evaluation while the material is degraded is particularly interesting for bone regeneration applications.

On the other hand, a deeper biological characterization would be useful to define the mechanism underlying the improvement of the cell affinity of the polycaprolactone matrix due to the presence of the additive particles.

Regarding the aloe vera coatings, a more exhaustive chemical characterization could provide interesting information to determine which of the components of the extract have a higher impact on the increase of the cell affinity of the structures evidenced in this work.

Finally, the use of an aloe vera coating on the surface of composite scaffolds is a research line which could provide scaffolds with remarkable improved properties compared to the State of Art polycaprolactone structures.





#### CONTENIDO

8.1. Introducción	216
8.2. Artículos	216
8.2.1. Three-dimensional printed polycaprolactone-mic scaffolds	•
8.2.2. Tunability of polycaprolactone hydrophilicity by caloading	•
8.3. Ponencias en congresos	218
8.3.1. Evaluation of the mechanical properties of 3D p cellulose-polycaprolactone scaffolds	•
8.3.2. Processability of microcrystalline cellulose-polycapro	•
8.3.3. Evaluation of carboxymethyl cellulose/pemicrocrystalline cellulose/polycaprolactone blends	

#### 8.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se detallan las publicaciones que se han realizado a partir de los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis doctoral. Estas publicaciones son dos artículos en revistas indexadas y tres ponencias en congresos.

Para cada uno de los artículos, se incluye la información bibliográfica básica, así como los correspondientes resúmenes. Cabe destacar que actualmente se está trabajando en la publicación de otros dos artículos, cuyos títulos son Microcrystalline filler in polycaprolactone matrices y Polycaprolactone-carboxymethyl cellulose composites for manufacturing porous scaffolds by material extrusion.

Por su parte, para las contribuciones a congresos se indican el título de la ponencia, así como los autores y el nombre y lugar de celebración del congreso. Se añade, además, el resumen enviado al comité organizador para la aceptación de la ponencia, así como el certificado de participación.

#### 8.2. ARTÍCULOS

#### 8.2.1. THREE-DIMENSIONAL PRINTED POLYCAPROLACTONE-MICROCRYSTALLINE CELLULOSE SCAFFOLDS

Nombre de la publicación: Three-dimensional printed polycaprolactonemicrocrystalline cellulose scaffolds.

Autores: María Elena Alemán-Domínguez, Elena Giusto, Zaida Ortega, Maryam Tamaddon, Antonio Nizardo Benítez, Chaozong Liu.

Revista: Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials

**DOI:** https://doi.org/10.1002/jbm.b.34142

#### Abstract:

Microcrystalline cellulose (MCC) is proposed in this study as an additive in polycaprolactone (PCL) matrices to obtain three-dimensional (3D) printed scaffolds with improved mechanical and biological properties. Improving the mechanical behavior and the biological performance of polycaprolactone-based scaffolds allows to increase the potential of these structures for bone tissue engineering. Different groups of samples were evaluated in order to analyze the effect of the additive in the properties of the PCL matrix. The concentrations of MCC in the groups of samples were 0, 2, 5, and 10% (w/w). These combinations were subjected to a thermogravimetric analysis in order to evaluate the influence of the additive in the thermal properties of the composites. 3D printed scaffolds were manufactured with a commercial 3D printer based on fused deposition modelling. The operation conditions have been established in order to obtain scaffolds with a 0/90° pattern with pore sizes between 450 and 500 µm and porosity values between 50 and 60%. The mechanical properties of these structures were measured in the compression and flexural modes. The scaffolds containing 2 and 5% MCC have higher flexural and compression elastic modulus, although those containing 10% do not show this reinforcement effect. On the other hand, the proliferation of sheep bone marrow



cells on the proposed scaffolds was evaluated over 8 days. The results show that the proliferation is significantly better (p < 0.05) on the group of samples containing 2% MCC. Therefore, these scaffolds (PCL:MCC 98:2) have suitable properties to be further evaluated for bone tissue engineering applications.

## 8.2.2. TUNABILITY OF POLYCAPROLACTONE HYDROPHILICITY BY CARBOXYMETHYL CELLULOSE LOADING

**Nombre de la publicación:** Tunability of polycaprolactone hydrophilicity by carboxymethyl cellulose loading.

**Autores:** M.E. Alemán-Domínguez, Z. Ortega, A.N. Benítez, G. Vilariño-Feltrer, J.A. Gómez-Tejedor, A. Vallés-Lluch

Revista: Journal of Applied Polymer Science

**DOI:** https://doi.org/10.1002/app.46134

#### **Abstract:**

Carboxymethyl cellulose (CMC) is herein proposed as additive in polycaprolactone (PCL) matrices to obtain composites with tunable hydrophilicity. This composite material can be obtained by compression molding. The thermogravimetric degradation profile, the FTIR spectra, values of the water contact angle (WCA), water and phosphate-buffered saline uptake values, and the results of a cytotoxicity assessment are presented herein. The concentrations of CMC in the groups of samples are 0, 2, 5, 10, and 20%. The WCA on the prewetted state decreases proportionally to the concentration of the additive. These results evidence the possibility of obtaining a PCL-based composite with tunable hydrophilicity. Besides, the biological assessment does not reveal any cytotoxic effects. Therefore, the addition of CMC entails an innovative strategy to control the water affinity of PCL in biomedical applications where such feature is required to improve diffusion of biological medium through, or accelerate degradation by hydrolysis.



#### 8.3. PONENCIAS EN CONGRESOS

#### 8.3.1. EVALUATION OF THE MECHANICAL PROPERTIES OF 3D PRINTED MICROCRYSTALLINE CELLULOSE-POLYCAPROLACTONE SCAFFOLDS

Título de la ponencia: Evaluation of the mechanical properties of 3D printed microcrystalline cellulose-polycaprolactone scaffolds.

Autores: M. E. Alemán, Z. Ortega, A. Benítez, C. Liu, M. Monzón

Nombre del congreso: British Orthopaedic Research Society Meeting 2017-Innovations in Orthopaedics.

Lugar de celebración: Londres, Reino Unido

#### Abstract:

In this study, microcrystalline cellulose (MCC) is proposed as an additive able to improve the mechanical properties of 3D printed polycaprolactone (PCL) scaffolds. Blends with different concentrations of microcrystalline cellulose (0, 2, 5 and 10% wt/wt) were obtained by thermal blending. Afterwards, this material was processed to obtain filaments suitable to be fed to a commercial fused deposition modelling 3D printer. Porous structures were manufactured using this technique and then they were subjected to 3 point bending testing, compression testing and X-ray microtomography scanning.

The flexural modulus increases significantly (p<0,05) for samples containing 2 and 5% of MCC, but remains constant for samples with 10% of additive when compared to pure PCL ones. On the other hand, the compression modulus values are in the interval for other structures already reported for bone regeneration and similar to the typical values of spongy bone for the samples containing less than 10% of the additive. The compressive strength is increased if the concentration of cellulose is 2 or 5%. However, for the samples with a concentration of 10% microcrystalline cellulose, it is possible to observe a decrease on the compressive modulus and the compressive strength.

The scanning of the samples through X-ray microtomography allowed to find out an explanation for the upper-limit of the microcrystalline cellulose concentration to obtain a reinforcement effect. The presence of numerous voids in the filaments in the samples containing 10% cellulose deteriorate the adhesion between layers and, therefore, their mechanical properties.







#### PROCESSABILITY MICROCRYSTALLINE CELLULOSE-8.3.2. OF POLYCAPROLACTONE COMPOSITES BY 3D PRINTING

Título de la ponencia: Processability of microcrystalline cellulose-polycaprolactone composites by 3D printing.

Autores: M.E. Alemán Domínguez, Z. Ortega, E. Medina, A.N. Benítez

Nombre del congreso: Sustainable Materials. Science and Technology.

Lugar de celebración: Las Palmas de Gran Canaria, España

#### Abstract:

#### 1. Introduction

Polycaprolactone is a material widely used in tissue engineering applications because of its biocompatibility, ease to process and slow degradation rate [1]. There is a large experience about the processing of the material by 3D printing techniques [2-4] to obtain parts for the biomedical sector.

However, the surface cell attachment and the wettability of the structures are limited because of the hydrophobic character of the material [1]. To overcome this limitation, there is a trend to develop new composite materials for additive manufacturing [5][6]. In this study, microcrystalline cellulose (MCC) has been proposed as an additive to polycaprolactone to obtain an innovative biocomposite suitable for fused deposition modelling.

#### 2. Experimental

Two polycaprolactone/ microcrystalline (PCL/MCC) blends were obtained: PCL/MCC 95/5 and PCL/MCC 90/10. The flow properties of the composite materials and the PCL were analysed. Three temperatures were chosen for each material and six shear rates were analysed for every temperature. The selection of the temperature and the shear rate values was based on the feasibility of the extrusion of material through the nozzle. The obtained viscosity data were used to correlate three viscosity models: exponential, second order and Cross-WLF.

The definition of the limits of an adequate window of operating conditions to extrude the composite materials was useful to set afterwards the printing parameters to obtain structures with a commercial 3D printer.

#### 3. Results and Discussion

The most suitable fitting model was the second order ones for PCL and PCL:MCC 95:5 and the Cross-WLF for PCL:MCC 90:10. Table 1 shows the fitting parameters of the equations for each material evaluated. Image 1 shows the structure of PCL/MCC printed parts.



**Table I.** Values of the fitting parameters of each viscosity model.

Material	Model	Values of the fitting parameters (SI units)
PCL	Second order	a=5,274; b=-1,787; c=0,05048; d=-0,02764; e=0,003398; f=-9,365·10 <sup>-5</sup>
PCL/MCC 95/5	Second order	a=21,53; b=0,8098; c=-0,04434; d=-0,09274; e=-2,934·10 <sup>-3</sup> ; f=5,692·10 <sup>-5</sup>
PCL/MCC 90/10	Cross-WLF	$D_1$ = 5,761·10 <sup>10</sup> ; $c_1$ =23,449; $n$ =-2,463·10 <sup>4</sup> ; $\tau_0$ = 5,5762·20 <sup>5</sup>

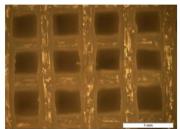


Image 1. PCL/MCC 95/5 printed part (Scale bar:1mm)

**4. Conclusions** - The viscosity models of PCL, PCL/MCC 95/5 and PCL/MCC 90/10 were obtained. Besides, 3D printed parts were obtained with the composite materials. These parts had a comparable mesostructure to PCL and, therefore, this study has confirmed the feasibility of printing microcrystalline cellulose/polycaprolactone blends.

#### 5. References

- [1] D. Mondal, M. Griffith, S.S. Venkatraman, *Int. J. Polym. Mat. Polym. Biomat.*, **65**, (2016) p.255-265.
- [2] D.W. Hutmacher, T. Schantz, I. Zein, K.W. Ng, S.H. Teoh, *J. Biomed. Mat. Res.*, **55**, (2001), p
- [3] W. Jiang, J. Shi, W. Li, K. Sun, *Polym. Eng. Sci.* **52**, 2396 (2012)
- [4] Y. Cai, J. Li, C. K. Poh, H. C. Tan, E. San Thian, J. Y. Hsi Fuh, *J. Mat. Chem. B* 1, 5971 (2013).
- [5] P. S. P. Poh, D. W. Hutmacher, B. M. Holzapfel, A. K. Solanki, *Acta Biomater*. **30**, (2016) p.319-333
- [6] J. L. Dávila, M. S. Freitas, P. Inforçatti Neto, Z. C. Silveira, J. V. L. Silva, M. A. D'Ávila, J. Appl. Polym. Sci. 133 (15), (2016) 43031.



19-21 July 2017 CANARY ISLANDS/SPAIN



Antonio Macias García, Chairman of the 2<sup>nd</sup> International Conference on Sustainable Materials Science and Technology (SMST2)

#### **CERTIFIES**

That MARIA ELENA ALEMAN DOMINGUEZ

has presented in the aforesaid Conference the oral communication entitled

PROCESSABILITY OF MICROCRYSTALLINE CELLULOSE-POLYCAPROLACTONE COMPOSITES BY 3D PRINTING

Las Palmas, 21" July, 2017



### CERTIFICATE OF PARTICIPATION







## 8.3.3. EVALUATION OF CELLULOSE/POLYCAPROLACTONE AND CELLULOSE/POLYCAPROLACTONE BLENDS

CARBOXYMETHYL MICROCRYSTALLINE

**Título de la ponencia:** Evaluation of carboxymethyl cellulose/polycaprolactone and microcrystalline cellulose/polycaprolactone blends

**Autores:** María Elena Alemán Domínguez, Zaida Ortega Medina, Antonio Nizardo Benítez Vega, Mario Monzón Verona

**Nombre del congreso:** 1<sup>st</sup> Young Researchers Workshop on Biomaterials and Applications.

Lugar de celebración: San Sebastián, España

#### **Abstract:**

The development of new composite materials for tissue engineering has a vital role in the improvement of scaffolds. The materials used in this application have to satisfy the mechanical requirements of the tissue grown on the structure. Furthermore, they should promote cell adhesion and proliferation on the surface of the scaffold to ensure the biofunctionality of the part. Most of the materials with adequate mechanical properties and biocompatibility (polylactic acid-PLA-, polycaprolactone -PCL- or polyglycolic acid-PGA-) do not have functional groups to establish interactions with the cells. For this reason, bioactive coatings are a widely used strategy to promote the adhesion and proliferation of the cells on the surface of a scaffold. [1,2] However, bioactive coatings usually do not interact with the polymeric matrix. To overcome this limitation, in this study the modification of the matrix is proposed as a strategy to enhance the adhesion of the coating. The procedure evaluated consists of using a composite matrix of polycaprolactone and a cellulosic derivate (carboxymethyl cellulose -CMC- and microcrystalline cellulose -MCC-) and coat this matrix with chitosan, a demonstrated bioactive and antimicrobial substance. The chemical affinity between the cellulosic derivate and the coating is higher than with the thermoplastic alone. Besides, these additives are expected to promote the adhesion of the cells in the long term, once the coating have disappeared because of its enzymatic degradation. This advantage is representative compared to the traditional functionalization strategies, which are based on surface treatments only useful for the first stage of the colonization of the scaffold. CMC:PCL 5:95, MCC:PCL 5:95 and pure PCL sheets were immersed in a solution of 2% chitosan in acetic acid 0,1 M. These sheets were analysed by infrared spectroscopy to evaluate if the introduction of CMC and MCC promotes the adhesion of chitosan. The signals at 1640 and 1560 cm-1, characteristic of the amine group in the chitosan structure, are not visible on pure PCL, significant on the CMC:PCL blends and negligible on MCC:PCL sheets. On the other hand, the absence of displacement of the carbonyl group signal reveals that there is no reaction between this group and the amine in the chitosan. Therefore, the interaction between the matrix and the coating is not based on chemical crosslinking between the phases, but on its adsorption.



#### References

[1] Sousa, I., Mendes, A., Pereira, R.F., Bartolo, P.J. (2014). Collagen surface modified poly (ε-caprolactone) scaffolds with improved hydrophilicity and cell adhesion properties. Materials Letters 134, 263-267. [2] Xiong, G., Luo, H., Zhang, C., Zhu, Y., Wan, Y. (2015). Enhanced biological behavior of bacterial cellulose scaffold by creation of macropores and surface immobilization of collagen. Macromolecular Research 23, 734-740.



# bioMAP15

## **Certificate of Participation**

## 1st Young Researchers Workshop on Biomaterials and Applications

19<sup>th</sup> - 20<sup>th</sup> October 2015 CIC biomaGUNE, San Sebastián, Spain

This is to certify that

## María Elena Alemán Domínguez

#### has presented the work entitled:

Evaluation of carboxymethyl cellulose/polycaprolactone and microcrystalline cellulose/polycaprolactone blends

as oral presentation

Pedro Ramos Cabrer (on behalf of the Organizing Committee of bioMAPP15)



