

Premio SOCIEMAT Mejor Trabajo de Fin de Grado en Ingeniería en Materiales 2023**FABRICACIÓN DE ANDAMIOS POROSOS REABSORBIBLES DE PLA
FUNCIONALIZADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MÚLTIPLE
(MWCNT)**

N. Álvarez, G. Pena¹, S. Barreiro¹

¹Departamento de Ingeniería de los materiales, mecánica aplicada y construcción, Escola de Enxeñaría Industrial, Universidade de Vigo, c/ Maxwell nº9, Campus Universitario Lagoas-Marcosende, 36210, Vigo, noa.alvarez@alumnos.uvigo.es

Resumen: La ingeniería de tejidos ha emergido como una solución prometedora para el tratamiento de lesiones óseas que no pueden regenerarse de manera natural mediante el uso de andamios tridimensionales que simulan la matriz extracelular para el crecimiento de tejido. Un andamio ideal debe estar hecho de un biomaterial biocompatible, bioactivo y biodegradable. El ácido poliláctico es un material prometedor pero su lenta degradación limita su uso. Por ello, se busca mejorar sus propiedades añadiendo nanotubos de carbono en diferentes proporciones. Están fabricados mediante una variación de la técnica de mezclado por fusión, posterior extrusión de pellets para impresión 3D. Los objetivos principales son la obtención de estos materiales compuestos y determinar si esta técnica conduce a mejores resultados de biocompatibilidad que la funcionalización superficial de PLA-VX con nanotubos de carbono. Se caracteriza con SEM, FTIR, Raman, TGA, DSC con el fin de optimizar su uso en la regeneración tisular.

Palabras clave: Impresión 3D, material biodegradable, ácido poliláctico, PLA, nanotubos de carbono, MWCNT, fabricación aditiva, fabricación por fusión, andamio tridimensional, regeneración ósea, caracterización térmica, biodegradación, funcionalización de superficie.

1. INTRODUCCIÓN.

La ingeniería tisular ósea surge como una solución prometedora para tratar los defectos óseos mediante la utilización de andamios tridimensionales que imitan la matriz extracelular para promover la regeneración de tejido.

Un andamio adecuado debe estar realizado en un material biodegradable y biocompatible, con una composición adecuada para proporcionar un entorno bioactivo en el que las células se adhieran y proliferen y que, tras realizar su función soporte, se degrade y reabsorba en el organismo sin que sus productos causen efectos nocivos. Además, tiene que tener una porosidad que se debe ajustar a las necesidades de las células del tejido que se va a regenerar y unas propiedades mecánicas similares a las del tejido óseo, en este caso (Figura 1).

La ingeniería de tejidos ha evolucionado significativamente desde la primera generación de materiales, caracterizada por el uso de biomateriales inertes que cursaban con fibrosis pasando por la actual tercera generación retratada por el desarrollo de materiales bioactivos y biodegradables, estimulando la respuesta celular hasta la creación de materiales inteligentes capaces de mejorar la regeneración tisular con estímulos externos o internos [1].

En este contexto, entre los materiales utilizados actualmente, el ácido poliláctico (PLA), aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para ser implantado en humanos, destaca por su biocompatibilidad, biorreabsorbibilidad y unas

propiedades mecánicas equilibradas. Sin embargo, presenta limitaciones como su superficie hidrofóbica y baja bioactividad [2]. Una estrategia para solucionarlo sería mediante la implementación de refuerzos, entre los que destacan los nanotubos de carbono (MWCNT), que cada vez tienen mayor relevancia, ya que proporcionarían propiedades mecánicas superiores e inducirían la osteogénesis gracias a la conducción de estímulos eléctricos, lo que abre las puertas a la cuarta generación de materiales. Sin embargo, uno de los grandes desafíos a los que se está enfrentando la comunidad científica es la gran dificultad en la disgregación e individualización de los nanotubos en la matriz [3].

Hay varias técnicas para fabricar los andamios. Los recursos más convencionales, como el colado en sólido con lixiviado con partículas, se caracteriza por el uso de disolventes que pueden ser citotóxicos para las células. De este modo, técnicas no convencionales como la fabricación aditiva, permiten superar estas limitaciones y, además, permiten la creación de estructuras tridimensionales complejas, regulares y precisas adaptadas al paciente [1]. Entre las técnicas de fabricación aditiva, hemos seleccionado la extrusión de pellets ya que abre nuevas posibilidades al poder trabajar con materiales que no existen comercialmente o la cantidad a fabricar es mínima, si bien no está libre de dificultades, ya que el material no es continuo y es una técnica novedosa en proceso de optimización.

Hay dos estrategias para incorporar los nanotubos al PLA ya sea mediante fusión en la matriz o añadiéndolos a la superficie del polímero.



Figura 1. Resumen gráfico de la definición del problema y la necesidad de materiales avanzados.

2. OBJETIVOS.

El objetivo principal es la obtención de los biomateriales compuestos de PLA-VX con distintas proporciones de nanotubos de carbono de pared múltiple mediante una adaptación de la técnica de mezclado por fusión. Además, se pretende determinar si esta técnica de fabricación conduce a mejores resultados de biocompatibilidad que la funcionalización superficial de andamios de PLA-VX.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

En este trabajo se pretende obtener el material compuesto de PLA y nanotubos de carbono. En primer lugar, se calcula el porcentaje en peso (p/p) de las muestras que se van a preparar. En este caso, se ha optado por tres concentraciones de MWCNT: 0.3%, 0,75% y 1.5%. La técnica utilizada, como ya se ha mencionado, es la de fusión-mezclado (*melt-mixing*) pero modificada para realizarla de forma manual, no mediante una tolva-extrusora, como es habitual. La fusión del polímero se realiza en una estufa a 234°C, temperatura a la cual se garantiza la completa fusión del polímero. Pasado un tiempo, se extrae el polímero y se traslada a una placa calefactora que se encuentra a la misma temperatura de la estufa. Se añaden los nanotubos mientras se agita vigorosamente. Para obtener los pellets, se utiliza una trituradora de plástico. Se guardan en un dispositivo de almacenamiento y secado de polímeros.

Una vez obtenido el material compuesto, se imprimen las probetas atendiendo diversas normas como ISO/FDIS 23317:2017 para la evaluación in vitro de la capacidad de formación de apatita del material implantable. Se utiliza para ello, una impresora de pellets de doble cabezal y cama caliente. Se ajustan algunos parámetros de impresión como la velocidad y la temperatura y se fabrican con dos tipos de patrón de relleno hexagonal y giroideo y en dos direcciones de impresión (longitudinal o transversal) para ver cuál es el efecto en las propiedades mecánicas.

Ya impresas las probetas de PLA sin aditar, se funcionaliza la superficie de alguna de ellas. Para ello, es necesario obtener una buena dispersión de nanotubos que garantizará una mayor probabilidad de adhesión de nanotubos y mayor efectividad. Para superar la dificultad que la hidrofobicidad de los nanotubos y su elevada energía superficial ofrece a su dispersión en un medio líquido, se ha optado por un método no covalente, que evita la modificación superficial de los MWCNT y la posible retención de ácidos, que limitarían la utilización de los andamios. Por este motivo, se han dispersado los MWCNT en agua destilada usando Bromuro de cetiltrimetilamonio

(CTAB) como tensioactivo, que actuaría formando micelas en torno a los nanotubos dispersándolos en una proporción 1:1:1. Para ello se ha calentado el agua a 30°C mediante agitación magnética a 640 rpm, para llegar a la temperatura Krafft del CTAB. Se añade el CTAB y los nanotubos y se dispersan mediante agitación magnética durante 15 min. Posteriormente se someten a un proceso de ultrasonificación de 40 min para romper los posibles agregados. Previa introducción de las probetas en la dispersión de nanotubos, se funcionaliza la superficie de éstas con NaOH para mejorar la hidrofiliía del polímero. Se dejan las probetas en la dispersión de MWCNT, a 200 rpm durante toda la noche para conseguir que se adhieran los nanotubos a la muestra. El procedimiento seguido se ilustra en la Figura 2.

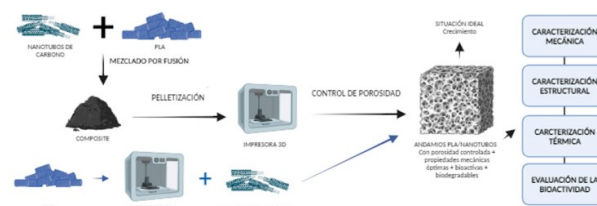


Figura 2. Resumen gráfico procedimiento experimental.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En primer lugar, antes de imprimir, se llevó a cabo una caracterización del material de partida, el PLA-VX, ya que se desconocen los aditivos que otorgan las características biocidas y es necesario para poder definir correctamente el proceso de impresión. De este modo, las características más destacadas obtenidas tras Calorimetría diferencial de barrido o DSC fueron que el polímero está completamente fundido a 176°C, presenta un pico asociado a la cristalización en frío, producido por una mayor orientación de las cadenas poliméricas como resultado del ablandamiento tras la transición vítrea que pueden generar nuevos núcleos de cristalización y/o cristalitos. Asimismo, el polímero sufre recristalización a 126°C. El porcentaje de cristalinidad de la muestra es del 17%. Se observa, además, alrededor de 105°C el punto de fusión del polietileno.

Cuando se incorporan de los nanotubos, en DSC, se pueden extraer tres conclusiones principales: 1) Aumento de la cristalinidad con la incorporación de las partículas, lo que evidencia el efecto nucleante de estos nanomateriales. 2) Disminución de la temperatura de transición vítrea con nanotubos, lo que implica una mayor movilidad de las cadenas. 3) Aumento de la temperatura de cristalización con la adición de nanotubos hasta un 8%, es decir, vuelve más rápido a una estructura cristalina, ratificando su efecto nucleante. El análisis termogravimétrico ilustra que la pérdida de masa experimentada es del 90,18%, pudiendo intuir que ese 10% restante corresponde a los aditivos incorporados y se empieza a degradar a 344°C, temperatura a la cual no es necesario llegar para poder imprimir correctamente.

Tras el proceso de incorporación por *melt-mixing* de los nanotubos de carbono en la matriz del PLA en diferentes concentraciones, se sometieron a un proceso de pelletización mediante un triturado mecánico y cizallado manual. Como puede verse en la Figura 3, la morfología de los granos no coincide con la de los pellets originales y se comprueba que existe una cierta dispersión de tamaños. Por ello se ha determinado la heterogeneidad del tamaño de los pellets producidos por este proceso, ya que puede tener influencia, en el proceso de extrusión en la impresión de las muestras. A nivel estadístico, no hay normalidad en los datos, correspondiendo hasta el 70% con un tamaño de partícula menor de 1,5 mm, por lo que cabría esperar una mayor continuidad en el flujo de extrusión.

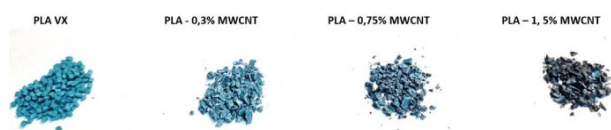


Figura 3. Morfología de los gránulos de materiales compuestos de PLA-MWCNT en comparación con los de PLA-VX comerciales.

En cuanto a la fabricación, se evaluó cómo influye la velocidad de impresión en la calidad de las probetas resultantes. Así, se ha visto cómo a mayor velocidad, la capacidad de extruir un filamento continuo disminuía considerablemente porque no permitía el tiempo suficiente para depositar el material, por lo que a priori, la velocidad escogida para las pruebas fue de 2100 mm/min. Por otra parte, la temperatura con mejores resultados obtenidos fue a 200°C, un valor en el cual el polímero está completamente fundido y, además, se mejora el índice de fluidez de éste, obteniendo una mayor facilidad de impresión.

Una alta porosidad mejora la superficie disponible para las células y la proliferación, en detrimento de las propiedades mecánicas. Es necesario tenerlo en cuenta ya que el andamio reabsorbible debe mantener su integridad hasta que se forme el nuevo tejido y sus propiedades deben ser suficientes. Se podría decir que no hay un gran consenso en la porosidad adecuada, ya que los resultados obtenidos en la literatura oscilan entre el 30% y el 90%. En este caso, la porosidad oscila entre el 9% y el 24% en el mejor de los casos, por lo que el patrón hexagonal se aproximaría más a lo reportado en la bibliografía.

Se determinó que el patrón de relleno influye en la resistencia a compresión del material sin aditivar, mostrando una diferencia del 129% entre patrones. La estructura hexagonal distribuye mejor los esfuerzos debido a su morfología y mayor porcentaje de relleno.

En los ensayos de tracción, hubo gran variabilidad en los resultados, sin diferencias significativas en resistencia a tracción entre patrones ni en la orientación. Por tanto, estos resultados se orientan más a los defectos de fabricación que a los de la propia estructura y orientación de impresión. Sin embargo, el patrón hexagonal longitudinal parece el más adecuado (al presentar mayor rigidez) para estudiar la adición de nanotubos de carbono. Cuando se analiza por SEM la

zona de fallo (Figuras 4 y 5), presenta un comportamiento frágil en el que destaca también la aparición de poros debido a la evaporación de productos volátiles y a 5000x se observan la gran cantidad de partículas incorporadas que corresponden a cobre y silicatos.

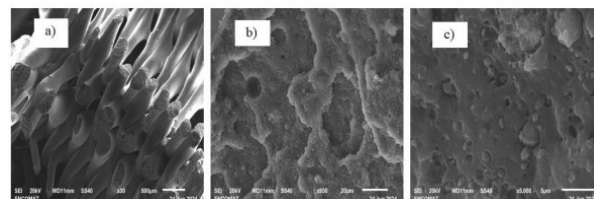


Figura 4. Zona de rotura de probeta de PLA sin MWCNT con patrón hexagonal dirección longitudinal.

Al incorporar nanotubos, se observó una disminución en el módulo de Young y en la resistencia a tracción, lo que puede estar relacionado con aglomeraciones que reducen la extrudibilidad que se pueden ver por SEM. Sin embargo, el que parece que tiene mayor resistencia a tracción es 0,75%. Además, el mecanismo de fallo fue moderadamente dúctil, posiblemente explicado por la capacidad de los nanotubos de deformarse y deslizarse, lo que permite que el material se deforme plásticamente. Asimismo, en cuanto a la dureza del nuevo material, a pesar de que el tamaño de huella se reduce con la incorporación de nanotubos, los datos estadísticos demostraron que se reduce ligeramente la dureza del material, causada por las aglomeraciones que introducen microdefectos en la matriz que afectan a esta propiedad.

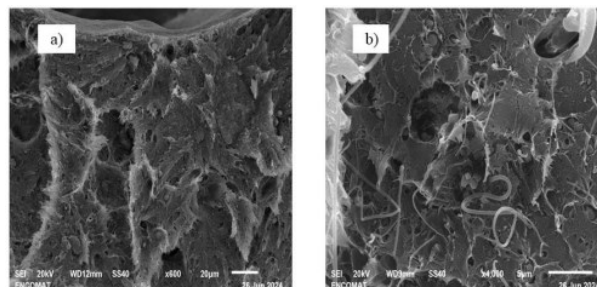


Figura 5. Zona de rotura de probeta de PLA/MWCNT 0,75% con patrón hexagonal dirección longitudinal.

Tras la inmersión de las probetas en fluido biológico simulado (SBF) para evaluar la biocompatibilidad de este material avanzado, la observación por microscopía óptica permite extraer varias conclusiones principales: se determina la aparición de hidroxiapatita en todas las muestras, siendo mayor cuando el material compuesto tiene 0,75% de nanotubos de carbono incrementándose en todas las zonas de la muestra. Con la funcionalización de la probeta superficialmente con nanotubos, se detecta también la aparición de hidroxiapatita pero con menor intensidad que con el material compuesto. Es decir, se corrobora la biocompatibilidad mejorada de los compuestos, comparadas con el PLA sin modificar y de la probeta funcionalizada (Figura 6).

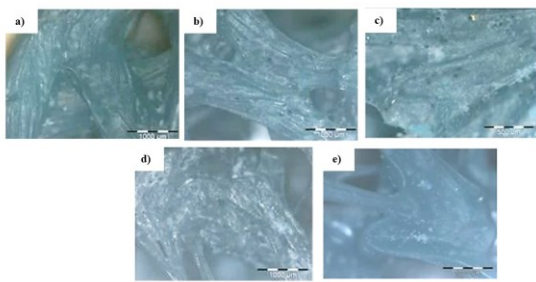


Figura 6. Micrografías LOM de las muestras: a) PLA sin aditivar, b) PLA/MWCNT0.3, c) PLA/MWCNT0.75, d) PLA/MWCNT1.5, e) PLA funcionalizado en superficie

Con SEM, se observa que en el PLA sin aditivar, fundamentalmente la hidroxiapatita se encuentra en surcos y recodos, mientras que con 0,75% está presente en toda la superficie (Figura 7).

En el PLA sin modificar, la hidroxiapatita está en forma de cristales con un crecimiento heterogéneo. Cuando se aumenta la concentración a 0,75%, tanto nanotubos individualizados como aglomeraciones están recubiertos con hidroxiapatita. La incorporación de nanotubos ha influenciado el proceso de nucleación y crecimiento de los cristales, mostrando dos morfologías diferentes, una muy parecida encontrada en el PLA sin aditivar, posiblemente debido a una dispersión irregular de nanotubos.

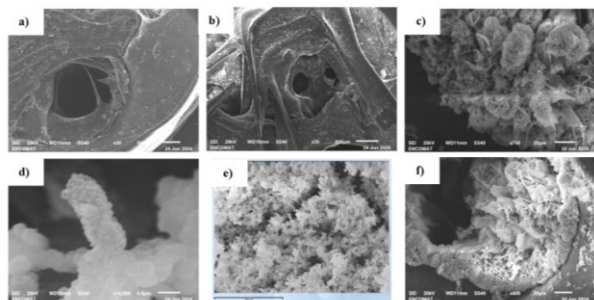


Figura 7. Micrografías SEM a) Superficie PLA sin aditivar, b) Superficie PLA/MWCNT0.75, c) Hidroxiapatita en PLA sin aditivar, d) Hidroxiapatita recubriendo nanotubos, e) y f) Tipos de hidroxiapatita en PLA/MWCNT0.75

En cuanto a la degradación del material en SBF, se ha presenciado un comportamiento muy llamativo. El tipo de patrón de relleno utilizado no parece afectar al proceso de degradación, pero sí la introducción de nanotubos de carbono, especialmente en la pérdida de volumen.

Como se desprende de la Figura 8, los ensayos de DSC tras la inmersión en SBF, permiten extraer cuatro conclusiones principales: 1) Hay una gran relajación entálpica que indica una mayor capacidad de la fase amorfa para relajarse y, además, aumenta la temperatura de transición vítrea. 2) Se tiene cristalización fría, que es más evidente en presencia de los nanotubos, posiblemente debido a una mejor difusión del agua gracias a las partículas. 3) Lo más llamativo son los dobles picos de fusión en las muestras con nanotubos, lo que implica un polimorfo, indicando que la inmersión en SBF altera la estructura cristalina, pero no el

porcentaje de cristalinidad. 4) Todo esto es un proceso físico, ya que tras el segundo calentamiento no se observan estos indicios.

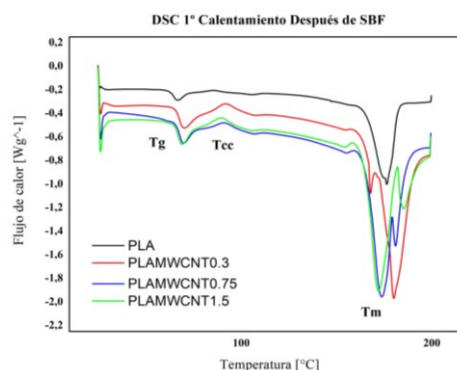


Figura 8. DSC muestras tras inmersión en SBF

Es decir, la adición de nanotubos de carbono en forma de aglomeraciones aumenta la degradación del material, ya que se produce una mayor movilidad de las cadenas y, por tanto, permite una mayor difusión del agua favoreciendo la hidrólisis.

5. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS.

En este trabajo se ha logrado fabricar andamios tridimensionales con material compuesto de PLA-VX y nanotubos de carbono (MWCNT), cumpliendo el objetivo principal del trabajo. Los andamios presentan una porosidad elevada y un tamaño de poro adecuado, siendo el óptimo el hexagonal. Aunque las propiedades mecánicas son aceptables, la presencia de aglomeraciones no mejora el comportamiento mecánico. Se observó la formación de hidroxiapatita en todas las muestras, especialmente en aquellas con un 0,75% de nanotubos, lo que indica mejora de la biocompatibilidad con respecto al PLA sin aditivar y la funcionalización de la superficie del PLA con nanotubos. Además, los nanotubos actúan como nucleantes y aumentan la degradación del material, lo que mejora su aplicabilidad en el campo biomédico. Como futuras investigaciones, se recomienda mejorar el método de aditivación de nanotubos y estudiar la rugosidad superficial y la mojabilidad para optimizar la adhesión celular. A pesar de las limitaciones, se ha dado un paso importante en la comprensión de estos materiales avanzados para la regeneración ósea.

6. REFERENCIAS.

- [1] Jang, J.W., "Review: Scaffold Characteristics, Fabrication Methods, and Biomaterials for the Bone Tissue Engineering", Ed. SpringerOpen, 2023
- [2] Modrák, M., "Biodegradable Materials for Tissue Engineering: Development, Classification and Current Applications," Ed. MDPI, 2023
- [3] Huang, B., "Fabrication and characterisation of 3D printed MWCNT composite porous scaffolds for bone regeneration", Ed. Materials Science and Engineering C, 2019