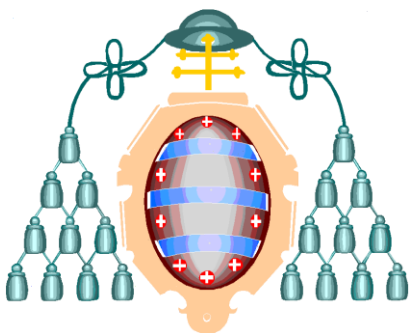


UNIVERSIDAD DE OVIEDO



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN SÍNTESIS Y REACTIVIDAD
QUÍMICA

**FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TINTAS
ORGÁNICAS PARA (BIO)IMPRESIÓN 3D**

TESIS DOCTORAL

Helena Herrada Manchón

2022

FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TINTAS ORGÁNICAS PARA (BIO)IMPRESIÓN 3D

Helena Herrada Manchón

Tesis propuesta como cumplimiento parcial de los requisitos para el doctorado en:

Síntesis y Reactividad Química

con mención de

Doctorado Industrial

Directores:

Enrique Aguilar Huergo

Manuel Alejandro Fernández Hernández

Universidad de Oviedo

Facultad de Química

Oviedo, Asturias

2022



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Formulación y caracterización de tintas orgánicas para (bio)impresión 3D.	Inglés: Formulation and characterization of organic inks for 3D (bio)printing.
2.- Autor	
Nombre: Helena Herrada Manchón	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

Bajo el nombre de impresión 3D se encuentra un grupo de tecnologías de fabricación que permiten manipular de manera automática distintos materiales —en ocasiones llamados “tintas”— y agregarlos capa a capa para construir un objeto tridimensional a partir de un modelo digital. Con la capacidad de imprimir estructuras con alto nivel de complejidad y precisión, la libertad de diseño y personalización sin coste adicional o la minimización de residuos, estas tecnologías se han convertido en una herramienta única para muchos sectores clave, entre los que se encuentra el sector salud. En esa línea, la presente tesis doctoral aborda el desarrollo y caracterización de tintas de carácter semisólido para su empleo en diferentes sectores estratégicos como la medicina regenerativa, la investigación médica o el sector farmacéutico, donde la impresión 3D tiene cada vez mayor importancia.

La investigación que se recoge en la presente Tesis comprende, en primer lugar, una introducción a los fundamentos de la impresión 3D, a las diferentes tecnologías que comprende y a su funcionamiento, además de una descripción detallada del equipo de impresión 3D empleado y de las bases de la reología, ciencia que estudia la deformación y el flujo de los materiales y cuyo conocimiento resulta fundamental para el desarrollo de tintas semisólidas aptas para su deposición mediante extrusión en cualquiera de las temáticas a explorar.

En el segundo capítulo se ha trabajado en la investigación médica, concretamente en la investigación contra el cáncer y en la aplicación de la bioimpresión 3D para la obtención de modelos tumorales tridimensionales que ayuden en la investigación de estas patologías y de su tratamiento. Así, se ha generado una tinta biomaterial específica, capaz de vehicular y mantener células vivas y funcionales, y se ha empleado para imprimir unas estructuras altamente reproducibles y de bajo coste mediante las cuales estudiar y analizar en detalle el comportamiento celular.

El tercer capítulo se enmarca en la medicina regenerativa, concretamente en la implementación de una nueva terapia para la regeneración ósea desarrollada dentro del proyecto de investigación europeo cmRNABone, en el que IDONIAL participa como socio. En esa línea, se han formulado tintas de tipo hidrogel con un elevado porcentaje de micropartículas con propiedades osteogénicas, mediante las cuales se ha podido evaluar, entre otros, el impacto del tamaño y la concentración de partículas sólidas en las propiedades de los fluidos y de las estructuras resultantes.

Finalmente, el último capítulo gira en torno al sector farmacéutico y a la dosificación personalizada de principios activos a través de la impresión 3D de medicamentos. En este campo, además de lograr formulaciones capaces de vehicular principios activos sin



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

comprometer su estabilidad, se ha validado la metodología de fabricación para demostrar el potencial real de la tecnología y avanzar en su posible implementación a medio-largo plazo en emplazamientos de interés, como pueden ser las farmacias hospitalarias o las oficinas de farmacia autorizadas para la elaboración de fórmulas magistrales y preparados oficinales.

RESUMEN (en Inglés)

3D printing encompasses a group of manufacturing technologies that allow different materials — sometimes called “inks”— to be automatically manipulated and added layer-by-layer to build a three-dimensional object from a digital model. With the ability to print highly complex and precise structures, the freedom of design and customization at no additional cost, or the minimization of waste, these technologies have become a unique tool for many key industries, including the healthcare sector. Along these lines, this doctoral thesis addresses the development and characterization of semi-solid inks for use in different strategic sectors such as regenerative medicine, medical research or the pharmaceutical sector, where 3D printing is becoming increasingly important.

The research included in this Thesis comprises, firstly, an introduction to the fundamentals of 3D printing, the different technologies contained and how they work, as well as a detailed description of the 3D printing equipment used and the bases of rheology, a science that studies the deformation and flow of materials and whose knowledge is essential for the development of semi-solid inks suitable for their deposition by extrusion in any of the topics to be explored.

The second chapter covers work on medical research, specifically in cancer research and the application of 3D bioprinting to obtain three-dimensional tumor models to help in the investigation of these pathologies and their treatment. Thus, a specific biomaterial ink capable of transporting and maintaining living and functional cells has been generated and used to print highly reproducible and low-cost structures by means of which to study and analyze cell behavior in detail.

The third chapter is framed in regenerative medicine, specifically in the implementation of a new therapy for bone regeneration developed within the European research project cmRNAbone, in which IDONIAL participates as a partner. Along these lines, hydrogel-type inks have been formulated with a high percentage of osteogenic microparticles, which have been used to evaluate, among others, the impact of the size and concentration of solid particles on the properties of fluids and the resulting structures.

Finally, the last chapter revolves around the pharmaceutical sector and the personalized dosage of active ingredients through 3D printing of medicines. In this field, in addition to achieving formulations capable of conveying active principles without compromising their stability, the manufacturing methodology has been validated to demonstrate the real potential of the technology and advance its possible implementation in the medium-long term in sites of interest, such as hospital pharmacies or pharmacies authorized for pharmaceutical compounding.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN SÍNTESIS Y REACTIVIDAD QUÍMICA**

“Es absurdo correr el riesgo de enloquecer por pura vanidad.”

Harry Beltik (Harry Melling) – Gambito de Dama

Agradecimientos

A mi marido, Víctor, por ser abrazo cálido en momentos de agotamiento y derrota, y por celebrar conmigo cada triunfo, por pequeño que fuere.

Als meus pares, per ensenyar-me a valorar tot a la vida i veure la feina i l'esforç que hi ha al darrere. A les meves àvies, que han sigut un tot referent per a mi, i als meus avis que em cuiden allà on són. Al meu germà, tiets, tietes, cosins i cosines que m'han abraçat amb força cada vegada que he tornat a la meva estimada Vilanova i la Geltrú.

A mi família política, por ayudarme a sentirme en casa estando a 800 km de la mía.

A Enrique Aguilar, por permitirme ser probablemente su doctoranda más peculiar; por tener siempre el tiempo para resolver mis cuestiones; por leer mis documentos con detenimiento y mimo y por ser un apoyo todos estos años. He sido muy afortunada por contar con un Director de Tesis como tú, gracias.

A M. Alejandro Fernández, por soltarme el rollo de la bioimpresión 3D en mi primer día en IDONIAL y enseñarme que eso era lo que yo quería hacer; por infinidad de cafés y un arroz con chipirones que recordamos asiduamente en casa. Has sido Director de Tesis, pero, sobre todo, has sido compañero y amigo.

A David Rodríguez por ser el mejor Partner in Lab y por hacer el día a día mucho más alegre y divertido. Eres todo luz.

Al resto de mis compañeros (y excompañeros) de IDONIAL (Ángel, Cebrián, Pelayo, Virginia, Paulino, Edu, Dani, Luis, Nuria, Silvia) porque de todos he aprendido, con todos me he reído, nos hemos enfadado juntos por cosas variopintas y hemos crecido personal y profesionalmente en el transcurso de estos años.

Gracias por todo.

Justificación y objetivos generales de la Tesis

Se entiende por Doctorado Industrial la tesis llevada a cabo en el seno de una empresa (del sector privado, del sector público o Administración Pública) en cualquier área de conocimiento, desarrollando un proyecto de investigación industrial o de desarrollo experimental. Como miembro del equipo de Mecatrónica e Industria Digital del Centro Tecnológico IDONIAL, la elaboración de la presente Tesis surgió del interés personal de profundizar tanto en el funcionamiento de las impresoras 3D fabricadas por el Centro Tecnológico como en el desarrollo de tintas acordes que sirvieran como base firme para justificar la capacidad de implementación de esta tecnología en diferentes áreas del sector salud.

En esa línea, la presente Tesis tiene dos objetivos generales principales muy diferenciados. Siendo yo el principal usuario de los equipos de impresión 3D de extrusión de semisólidos del Centro desde 2017, el primero de los objetivos responde a la necesidad clara de documentar y recopilar el conocimiento y la experiencia adquirida en la temática a lo largo de los años. Con ello, se pretende favorecer la transferencia de tecnología y de conocimiento al dotar de documentación clara y accesible tanto al personal de IDONIAL (actual o a las nuevas incorporaciones) como al resto de la comunidad científica que se encuentre trabajando en esta tecnología todavía incipiente y de la cual se dispone de limitada información a nivel técnico.

El segundo de los objetivos principales se centra en la generación de tintas de tipo semisólido para su empleo en tres ramas distintas relacionadas con el sector salud. La primera temática seleccionada es el cáncer y la aplicación de la bioimpresión para lograr obtener modelos tumorales tridimensionales que ayuden en la investigación de estas patologías y su tratamiento. Así pues, se pretende generar de una tinta biomaterial, capaz de vehicular y mantener células vivas, y emplearla para imprimir estructuras altamente reproducibles y de bajo coste mediante las cuales estudiar y analizar el comportamiento celular. La segunda temática tratada se enmarca en la medicina regenerativa,

concretamente en la implementación de una nueva terapia para la regeneración ósea dentro del proyecto de investigación europeo cmRNAbone, en el que IDONIAL participa como socio. En esa línea, el propósito principal de la investigación es formular tintas de tipo hidrogel con un elevado porcentaje de material con propiedades osteogénicas, mediante las cuales validar los equipos de impresión fabricados por el Centro Tecnológico para satisfacer las necesidades del proyecto. Finalmente, la tercera temática gira en torno al sector farmacéutico y a la dosificación personalizada de principios activos a través de la impresión 3D de medicamentos. En este campo, además de lograr una formulación capaz de vehicular principios activos sin comprometer su estabilidad, se pretende validar la metodología de fabricación para demostrar el potencial real de la tecnología y avanzar en su posible implementación a medio-largo plazo en emplazamientos de interés, como pueden ser las farmacias hospitalarias o las oficinas de farmacia autorizadas para la elaboración de fórmulas magistrales y preparados oficinales.

En el transcurso de la presente tesis he tenido la oportunidad de participar en un número considerable de proyectos de investigación centrados en la impresión 3D en salud gracias a los cuales he podido vislumbrar que, en un campo tan complejo y multidisciplinar como este, existe una carencia de investigadores que ejerzan de nexo de conexión entre el personal especializado (biólogos, biotecnólogos, médicos, enfermeros, etc.) —destinados de forma general a ser los usuarios finales de los equipos de impresión—, y los ingenieros (mecánicos, electrónicos e informáticos) capaces de diseñar y fabricar impresoras 3D/bioimpresoras con las mejores prestaciones y características a nivel *hardware* y *software*. Existe un vacío de conocimiento justo en el centro que es imprescindible llenar para que la implementación de estas tecnologías llegue a ser un éxito real, y en ese lugar concreto es en el que se sitúa esta Tesis.

Contenidos

Pág.

Capítulo 1. Introducción y consideraciones teóricas de la impresión 3D	1
1.1. Impresión 3D: historia y evolución	3
1.2. Tecnologías de fabricación aditiva	7
1.3. Funcionamiento y manejo de una impresora 3D de extrusión de semisólidos ..	12
1.3.1. Descripción de la impresora bIDO-I	13
1.3.2. Creación del modelo 3D y obtención del archivo STL	15
1.3.3. Programas de laminado y archivos G-code	17
1.3.4. Configuración y preparación de la impresora	28
1.3.5. Postprocesado y retirada de las piezas finales	32
1.4. Reología e impresión 3D	34
1.4.1. Fundamentos de reología	34
1.4.2. Evaluación de la imprimibilidad	46
1.4.3. Evaluación del efecto de la reticulación en la rigidez de las impresiones	51
Capítulo 2. Impresión de matrices tridimensionales para el cultivo de células	
	tumorales 53
2.1. Introducción y motivaciones	55
2.2. Objetivos	58
2.3. Selección de componentes y obtención de las tintas biomateriales y biotintas .	59
2.3.1. Descripción de los materiales seleccionados	59
2.3.2. Preparación de las tintas biomateriales/biotintas	68
2.4. Análisis reológico de las tintas	74
2.4.1. Materiales y métodos	74
2.4.2. Resultados	75
2.5. Evaluación de la rigidez de la tinta biomaterial y selección del tiempo de reticulación	82
2.5.1. Materiales y métodos	82
2.5.2. Resultados	83
2.6. Proceso de impresión de las matrices tridimensionales	85
2.6.1. Selección y configuración del modelo 3D para la fabricación de las matrices tridimensionales	85
2.6.2. Impresión, reticulación y conservación de las muestras	88
2.7. Viabilidad y proliferación de células tumorales sembradas en andamios impresos	90
2.7.1. Materiales y métodos	90
2.7.2. Resultados	90

2.8.	Viabilidad y proliferación de células tumorales bioimpresas.....	93
2.8.1.	Materiales y métodos	93
2.8.2.	Resultados	94
2.9.	Valoración del capítulo.....	97
2.10.	Conclusiones	99
Capítulo 3.	Tintas biomateriales para regeneración ósea	101
3.1.	Introducción y motivaciones.....	103
3.2.	Objetivos.....	107
3.3.	Selección de componentes – formulación de la tinta.....	108
3.3.1.	Descripción de los materiales seleccionados	108
3.3.2.	Preparación de las tintas	111
3.4.	Análisis reológico	113
3.4.1.	Materiales y métodos	113
3.4.2.	Resultados	114
3.5.	Evaluación de la rigidez de la tinta biomaterial y selección del tiempo de reticulación	122
3.5.1.	Materiales y métodos	122
3.5.2.	Resultados	123
3.6.	Proceso de impresión	126
3.6.1.	Selección y configuración de los modelos 3D.....	126
3.7.	Evaluación de la rigidez de las estructuras en función de los parámetros de impresión.....	130
3.7.1.	Materiales y métodos	130
3.7.2.	Resultados	131
3.8.	Estudio de la proporción de hinchamiento de las tintas de BCP en estructuras tridimensionales impresas	135
3.8.1.	Materiales y métodos	135
3.8.2.	Resultados	136
3.9.	Valoración del capítulo.....	142
3.10.	Conclusiones	144
Capítulo 4.	Impresión de medicamentos paciente-específicos en forma de gominola	145
4.1.	Introducción y motivaciones.....	147
4.2.	Objetivos.....	152
4.3.	Selección de componentes y obtención de la fórmula base	154
4.3.1.	Descripción de los materiales seleccionados	154
4.3.2.	Experimento factorial completo: obtención de la fórmula base	157
4.3.3.	Selección del principio activo: clorhidrato de ranitidina	166
4.3.4.	Adición de excipientes auxiliares y protocolo final de formulación: obtención de las tintas F1-F4	168
4.4.	Análisis reológico de las tintas farmacéuticas	172
4.4.1.	Materiales y métodos	172
4.4.2.	Resultados	173
4.5.	Caracterización del principio activo en la fórmula.....	182
4.5.1.	Difracción de Rayos X de Polvo (XRPD)	183
4.5.2.	Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)	185
4.6.	Proceso de impresión y validación de la tecnología para la fabricación de unidades posológicas	187

4.6.1. Selección y configuración de los modelos 3D para la fabricación de las drugmies	189
4.6.2. Ensayo de Identificación	194
4.6.3. Ensayo de Uniformidad de Masa	201
4.6.4. Ensayo de Uniformidad de Contenido.....	205
4.6.5. Ensayo de disolución.....	211
4.7. Valoración del capítulo	219
4.8. Conclusiones.....	222
Bibliografía	223
Anexos	251
Publicaciones	259

Lista de figuras

Pág.

Figura 1.1-1. Hilo temporal con los eventos de mayor relevancia en la historia de la impresión 3D. Extraído y adaptado de (Jakus, 2019).	4
Figura 1.1-2. Esquema de la combinación de diferentes biomateriales y tipos celulares para generar un modelo 3D complejo. Extraído de (Potjewyd et al., 2016).....	5
Figura 1.1-3. Expectativas de crecimiento para el mercado de materiales por región. Extraído de (Markets and Markets, 2020).....	6
Figura 1.2-1. Esquema de una impresora de fotopolimerización en tanque o cuba. Extraído de (Redwood et al., 2017).	8
Figura 1.2-2. Esquema de una impresora de proyección de material. Extraído de (Redwood et al., 2017).	8
Figura 1.2-3. Esquema de una impresora de proyección de aglutinante. Extraído de (Redwood et al., 2017).	9
Figura 1.2-4. Esquema de una impresora de fusión de lecho de polvo. Extraído de (Redwood et al., 2017).	10
Figura 1.2-5. Esquema de una impresora de fabricación con filamento fundido (FFF). Extraído de (Redwood et al., 2017).	10
Figura 1.3-1. Etapas generales del proceso de impresión 3D.....	12
Figura 1.3-2. Fotografía (izda.) y esquema de las distintas partes (dcha.) de la impresora BIDO-I.	14
Figura 1.3-3. Diagrama del sistema de extrusión que muestra el motor paso a paso, los engranajes y la varilla roscada que presionará el émbolo de la jeringa.	15
Figura 1.3-4. Esfera representada en tres resoluciones diferentes. Extraído y adaptado de (Giang, 2019).	16

Figura 1.3-5. Previsualización en Slic3r de una misma figura con distintas alturas de capa (0,2mm; 0,4mm y 0,8mm respectivamente).	18
Figura 1.3-6. Previsualización en Slic3r de la primera capa de una figura con dos y tres perímetros, de izquierda a derecha.	19
Figura 1.3-7. Previsualización en Slic3r de una capa con porcentajes de relleno equivalentes al 30%, 60% y 90%, de izquierda a derecha.	19
Figura 1.3-8. Previsualización en Slic3r de una figura con el mismo porcentaje de relleno (60%) pero con patrón rectilíneo, concéntrico, o panal de abeja (de izquierda a derecha, en ese orden).	20
Figura 1.3-9. Previsualización en Slic3r de una capa con ángulo de relleno de 45°, 67° y 90° (de izquierda a derecha).	20
Figura 1.3-10. Previsualización en Slic3r de un mismo modelo 3D con skirt (A), brim (B), material de soporte (C) y raft (D).	21
Figura 1.3-11. Distintos anchos de extrusión para una misma altura de capa. Extraído de (Slic3r.org).	23
Figura 1.3-12. Representación de una extrusión deficiente, excesiva y correcta.	23
Figura 1.3-13. Fórmula de Slic3r para el cálculo del ancho de extrusión. Extraído de (Slic3r.org).	24
Figura 1.3-14. Esquema del proceso de difusión de un hidrogel sobre el soporte de impresión y entre capas sucesivas. Extraído y modificado de (He et al., 2016).	24
Figura 1.3-15. Modificación del ancho de extrusión para mejorar la consecución de forma.	25
Figura 1.3-16. Ejemplo de archivo G-code.	26
Figura 1.3-17. Proceso de carga de las jeringas en la impresora.	29
Figura 1.3-18. Influencia de la altura de la boquilla en el trazo resultante.	30
Figura 1.3-19. Ejemplo de impresión en soporte FRESH. Extraído de (Hinton et al., 2015).	31
Figura 1.3-20. Operario realizando trabajos de postprocesado. Extraído de (Vázquez, 2019).	32
Figura 1.4-1. Clasificación reológica de los fluidos.	35
Figura 1.4-2. Ejemplo de reograma de dos fluidos newtonianos distintos.	36
Figura 1.4-3. Tipos de fluidos independientes del tiempo. Extraído de (Chhabra and Richardson, 2008).	37

Figura 1.4-4. Ejemplo de aplicación de la Ley de Potencia. Extraído de (Lakkanna et al., 2016).....	38
Figura 1.4-5. Formas generales de las expresiones empíricas para los viscoplásticos. Extraído de (Bird et al., 1983).....	40
Figura 1.4-6. Esquema representativo del comportamiento de un fluido dilatante.	42
Figura 1.4-7. Comportamiento de los fluidos dependientes del tiempo a una velocidad de corte y temperatura constantes. Extraído de (Sochi, 2010).	43
Figura 1.4-8. Reograma que ejemplifica el bucle de histéresis para los fluidos tixotrópicos y los fluidos reopéticos. Extraído de (Sochi, 2010).	44
Figura 1.4-9. Esquema de funcionamiento de la reometría oscilatoria. Extraído de (Malvern Instruments, 2016).	45
Figura 1.4-10. Puntos críticos de la extrusión afectados por la reología de la tinta.....	46
Figura 1.4-11. Aspecto del barrido de esfuerzo para determinar la LVR. Extraído de (Anton Paar GmbH, 2021).	49
Figura 1.4-12. Determinación de la tensión umbral mediante intersección de tangentes. Extraído de (Cyriac et al., 2015).	50
Figura 1.4-13. Procedimiento utilizado para determinar el umbral de fluencia a partir de la gráfica esfuerzo - deformación oscilatoria. Extraído de (Cyriac et al., 2015).....	50
Figura 1.4-14. Variación en la rigidez de los tejidos. Extraído de (Cox & Erler, 2011).....	52
Figura 2.1-1. Coste total anual del cáncer a la sociedad española. Extraído de (Asociación Española contra el Cáncer (AECC), 2020).	55
Figura 2.1-2. La bioimpresión 3D en el descubrimiento de nuevos fármacos. Extraído de (Forget & Dagarville, 2017).....	57
Figura 2.3-1. Contenido aproximado de colágeno en diferentes tejidos. Extraído de (Elsevier Connect, 2019).	60
Figura 2.3-2. Características de la molécula de colágeno. Extraído de (Lizarbe, 2001)..	60
Figura 2.3-3. Procesamiento de colágeno para extracción de gelatina. Extraído de (Campiglio et al., 2019).	62
Figura 2.3-4. Ácido gúlico (A), ácido manurónico (B) y bloques gúlicos y manurónicos que componen el alginato (C). Extraído de (Ore B. et al., 2020).	63
Figura 2.3-5. Gelificación de una solución de alginato con la adición de iones de calcio o magnesio. Extraído de (Wan et al., 2008).....	64
Figura 2.3-6. Escala colorimétrica del rojo de fenol. (CC BY-SA 4.0, vía Wikimedia Commons).....	65

Figura 2.3-7. Cámara de Neubauer (izda.) y retículo de conteo (dcha.). (CC BY-SA 4.0, vía Wikimedia Commons).	70
Figura 2.3-8. Esquemas de protocolo de conteo en zigzag (izda.) y de visualización de células viables y no viables (dcha.).	71
Figura 2.3-9. Protocolo de formulación de la parte A de la biotinta.....	71
Figura 2.3-10. Protocolo de formulación de la parte B de la biotinta.....	72
Figura 2.3-11. Detalle de las jeringuillas con parte A (izda.) y parte B (dcha.) unidas con el conector de transferencia tipo hembra-hembra.	73
Figura 2.4-1. Reogramas de las tintas biomateriales a 25 °C.....	75
Figura 2.4-2. Ensayo SFM para evaluación de la tixotropía de las tintas biomateriales...	77
Figura 2.4-3. Representación de los porcentajes de recuperación de la viscosidad calculados transcurridos 40 s y 120 s desde la segunda etapa (100 s^{-1}).	77
Figura 2.4-4. Barridos de esfuerzo de las tintas biomateriales.	78
Figura 2.4-5. Determinación gráfica de τ_0 para las diferentes tintas biomateriales.....	79
Figura 2.4-6. Barridos de frecuencia para las tintas 1:1, 3:1 y 1:3.....	80
Figura 2.4-7. Comparativa de la variación de la tangente de pérdidas con respecto a la frecuencia para las tintas 1:1, 3:1 y 1:3.	80
Figura 2.5-1. Medición de la rigidez de la tinta 1:1 a distintos tiempos de reticulación: (A) preparación del hidrogel en recipiente, (B) reticulación con CaCl_2 , (C) colocación de la muestra en el plato del reómetro, (D) ajuste del plato superior.	83
Figura 2.5-2. Barridos de amplitud para valoración de la rigidez de los hidrogeles de tinta 1:1 a distintos tiempos de reticulación.....	84
Figura 2.6-1. Detalle de las placas Ibidi® seleccionadas como soportes de impresión para la fabricación de las matrices. Extraído de (Ibidi GmbH, 2021).	85
Figura 2.6-2. Previsualización en Slic3r de la estructura de los modelos y detalle de su porosidad.	86
Figura 2.6-3. Imagen fotográfica del proceso de impresión (izda.) y de una figura impresa terminada (dcha.).	88
Figura 2.6-4. Imagen estereomicroscópica de los modelos A (izda.) y B (dcha.) impresos. Las barras de escala corresponden a 1 mm.	89
Figura 2.7-1. (A) Células sembradas sobre hidrogeles impresos usando el modelo A. Escala: 500 μm . (B) Imágenes representativas de los esferoides multicelulares autoensamblados a las 96 h de incubación sobre el modelo B de estructura. Escala 50 μm . Imágenes cedidas por FINBA.	91

Figura 2.7-2. Diferencias observables en la arquitectura de un gel de colágeno polimerizado a 37 °C (A), 21 °C (B), 16 °C (C) y 4 °C (D). Extraído y adaptado de (Doyle, 2016).	91
Figura 2.8-1. Imagen en campo claro de estructura bioimpresa donde se pueden observar las células 786-O. La barra de escala equivale a 500 µm. Imágenes cedidas por FINBA.	94
Figura 2.8-2. Imágenes microscópicas de fluorescencia y de campo claro de las células 786-O que expresan la proteína GFP (flechas) -algunas de ellas desenfocadas debido a su ubicación en diferentes posiciones z-. La barra de escala equivale a 100 µm. Imágenes cedidas por FINBA.	95
Figura 2.8-3. Proyecciones XY (imágenes superiores) y XZ (imágenes inferiores) de las estructuras tridimensionales con las células teñidas para el análisis de la viabilidad celular. Imágenes cedidas por FINBA.	95
Figura 3.1-1. Infografía sobre la prevalencia de la osteoporosis estudiada en seis países europeos. Extraído de (International Osteoporosis Foundation, 2020).	103
Figura 3.1-2. Logo del proyecto. Extraído de (cmRNAbone Project, 2020).	104
Figura 3.3-1. Imagen estereomicroscópica de los gránulos de BCP2 (A, B) y BCP1 (C, D). Barras de escala: 200 µm (A, D), 100 µm (B, C).	109
Figura 3.3-2. Estructura de la goma xantana. Extraído de (Nasrollahzadeh et al., 2021).	110
Figura 3.3-3. Esquema del protocolo de formulación de las tintas de BCP.	112
Figura 3.3-4. Aspecto de las mezclas en las diferentes etapas de formulación de las tintas de BCP.	112
Figura 3.4-1. Reograma de las tintas de BCP a 37 °C.	115
Figura 3.4-2. Ensayo SFM de las tintas de BCP a 37 °C.	117
Figura 3.4-3. Representación de los porcentajes de recuperación de la viscosidad calculados transcurridos 40 s y 120 s desde la segunda etapa (100 s ⁻¹) a 37 °C.	118
Figura 3.4-4. Ensayo SFM de las tintas de BCP a temperatura ambiente.	118
Figura 3.4-5. Representación de los porcentajes de recuperación de la viscosidad calculados transcurridos 40 s y 120 s desde la segunda etapa (100 s ⁻¹) a temperatura ambiente.	119
Figura 3.4-6. Barridos de esfuerzo de las tintas de BCP para determinación de la LVR.	119
Figura 3.4-7. Ensayo SDM de las tintas de BCP a temperatura ambiente.	120

Figura 3.4-8. Representación de los porcentajes de recuperación de la viscosidad calculados transcurridos 30 s y 60 s desde la segunda etapa (20% de oscilación) a temperatura ambiente.	121
Figura 3.5-1. (A) Proceso de impresión de los moldes de PLA a medida por FDM. (B) Detalle del molde impreso. (C) Muestra de tinta dentro del molde y protegida con film para su conservación a 4 °C.	122
Figura 3.5-2. Rigidez de las muestras de BCP sin reticular.	123
Figura 3.5-3. Rigidez de las muestras de BCP tras 2 minutos sumergidas en solución de CaCl ₂ al 0.5% (p/v).	124
Figura 3.5-4. Rigidez de las muestras de BCP tras 5 minutos sumergidas en solución de CaCl ₂ al 0.5% (p/v).	124
Figura 3.5-5. Gráfica comparativa de los valores de G' al 1% de oscilación para las tintas con diferente grado de reticulación.	125
Figura 3.5-6. Imágenes microscópicas de las muestras moldeadas para la evaluación de sus propiedades mecánicas. Las barras de escala equivalen a 1 mm.	125
Figura 3.6-1. Imagen termográfica del proceso de impresión de las tintas de BCP.	126
Figura 3.6-2. Representación del grosor del trazo y su desviación estándar a distintas velocidades.	128
Figura 3.6-3. Ajuste del ancho de extrusión de las tintas BCP.	129
Figura 3.6-4. Modelo de falange impreso con las tintas de BCP y aspecto de las figuras deshidratadas finales.	129
Figura 3.7-1. (A) Previsualización en Slic3r de las estructuras resultantes de la combinación de dos patrones de relleno con dos porcentajes de relleno. (B) Detalle de la colocación de un disco impreso entre los platos del reómetro con el mismo tamaño (25 mm).	130
Figura 3.7-2. Imágenes fotográficas y microscópicas de los discos impresos con diferentes parámetros. Barras de escala: 2 mm.	132
Figura 3.7-3. Barridos de amplitud para determinar la rigidez de las figuras impresas en 3D con la tinta 15BCP1.	133
Figura 3.7-4. Barridos de amplitud para determinar la rigidez de las figuras impresas en 3D con la tinta 30BCP2.	133
Figura 3.7-5. Barridos de amplitud para determinar la rigidez de las figuras impresas en 3D con la tinta 15BCP2.	134
Figura 3.7-6. Valores de G' al 1% de deformación para patrones rectilíneos (R) y panal de abeja (HC) al 60% o 75% de relleno (D).	134

Figura 3.8-1. (A) Proceso de impresión de los cubos. (B) Detalle del aspecto y las dimensiones de los cubos impresos.	137
Figura 3.8-2. Proporción de hinchamiento (SR%) calculado para los cubos frescos introducidos en PBS.	137
Figura 3.8-3. Aspecto de los cubos deshidratados.	139
Figura 3.8-4. Proporción de hinchamiento (SR%) calculado para los cubos deshidratados introducidos en PBS.	140
Figura 3.8-5. Imágenes de las figuras rehidratadas transcurridas 5 horas (izq.) y 24 horas (dcha.) sumergidas en PBS.	140
Figura 4.1-1. Procedimiento de fabricación ZipDose® (Aprecia Pharmaceuticals, LLC).	148
Figura 4.1-2. Tecnología de fabricación MED™ (Triastek, Inc.).....	149
Figura 4.3-1. Estructuras de las moléculas de amilosa y amilopectina. (CC BY-SA 4.0, vía Wikimedia Commons).	155
Figura 4.3-2. Estructuras de los carragenatos kappa, iota y lambda. (CC BY-SA 4.0, vía Wikimedia Commons).	156
Figura 4.3-3. Mecanismo de gelificación de los carragenatos. Extraído de (Pacheco-Quito et al., 2020).	157
Figura 4.3-4. Previsualización del disco 3D seleccionado (A) y de la pieza laminada conforme a los parámetros de impresión fijados.....	159
Figura 4.3-5. Diagrama de selección de tintas.....	160
Figura 4.3-6. (A) Separación de fases en reposo. (B) Impresión con tinta 1 a 25 °C. (C) Impresión con tinta 2 a 25 °C.	162
Figura 4.3-7. Ejemplo de formas iglú (A) y tronco de cono (B) obtenidas con tinta 7 a 35 °C y 25 °C, respectivamente. (C) Disco con defectos, obtenido con tinta 8 a 35 °C.	163
Figura 4.3-8. Impresiones a temperatura ambiente con tinta 9 (A) y tinta 10 (B).	164
Figura 4.3-9. Impresión con tinta 13 a temperatura ambiente (A) y a 35 °C (B). Impresión con tinta 14 a 35 °C (C).	164
Figura 4.3-10. Impresiones con tinta 11 a temperatura ambiente (A) y a 35 °C (B).	165
Figura 4.3-11. Figuras impresas a temperatura ambiente y a 35 °C con tinta 12.....	165
Figura 4.3-12. Impresiones con tinta 15 a 35 °C (A). Impresiones con tinta 16 a temperatura ambiente (B) y a 35 °C (C).	166
Figura 4.3-13. Estructura del clorhidrato de ranitidina.....	167
Figura 4.3-14. Esquema del protocolo final de formulación de las tintas farmacéuticas.	169

Figura 4.3-15. Aspecto de la mezcla carragenato iota – almidón de maíz – goma xantana.	170
Figura 4.3-16. Aspecto de la fórmula tras la incorporación de la gelatina.....	170
Figura 4.4-1. Reogramas de las tintas F1-F4 a 23 °C (arriba) y 37 °C (abajo).	173
Figura 4.4-2. Ensayo de recuperación para evaluación de la tixotropía de las tintas F1-F4.	175
Figura 4.4-3. Representación de los porcentajes de recuperación de la viscosidad calculados transcurridos 40 s y 120 s desde la segunda etapa (100 s^{-1}).....	176
Figura 4.4-4. Barridos de esfuerzo de F1-F2 (arriba) y F3-F4 (abajo) realizados a 23 °C y 37 °C.....	178
Figura 4.4-5. Barridos de frecuencia de F1-F2 (arriba) y F3-F4 (abajo) realizados a 23 °C y 37 °C.....	180
Figura 4.4-6. Comparativa de la variación de la tangente de pérdidas con respecto a la frecuencia a 23 °C y 37 °C.....	181
Figura 4.5-1. Preparación de las muestras para el análisis XRPD. Imagen cedida por Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Oviedo.	184
Figura 4.5-2. Difractogramas correspondientes al clorhidrato de ranitidina y a las tintas F2 y F4.....	184
Figura 4.6-1. Previsualización del modelo a ejecutar con 1 falda (A) y 3 faldas (B) e identificación de los lados a medir.....	191
Figura 4.6-2. Representación del grosor del trazo y su desviación estándar a distintas velocidades.....	192
Figura 4.6-3. (A) Proceso de impresión de una drugmie. (B) Imagen termográfica de la gelificación in situ de la tinta inducida por la temperatura.....	194
Figura 4.6-4. Apariencia de los distintos modelos de drugmies impresas con F1: corazón (A), osito 80% (B), osito 65% (C) y disco (D).....	196
Figura 4.6-5. Apariencia de las drugmies impresas combinando fórmula-modelo: (A) F1 – disco; (B) F2 – corazón; (C) F3 – osito 80% y (D) F4 – osito 65%.....	197
Figura 4.6-6. Detalle de osito con densidad de relleno al 65% (dcha.) y al 80% (izda.).	199
Figura 4.6-7. Detalle del procedimiento de medida con calibre de la longitud de las figuras impresas con F1.	200
Figura 4.6-8. Delaminación tras manipulación prolongada en figura de baja densidad de relleno.....	201
Figura 4.6-9. Detección de λ_{max} y representación gráfica de la curva de calibrado.....	208

Figura 4.6-10. Esquema de los aparatos de disolución tipo 1 (izda.) y tipo 2 (dcha.).....	212
Figura 4.6-11. Aparato tipo USP-II estandarizado empleado para el estudio de liberación.	213
Figura 4.6-12. Perfil de disolución de las drugmies impresas con la fórmula F2.....	216
Figura 4.6-13. Perfil de disolución de las drugmies impresas con la fórmula F4.....	216
Figura 4.6-14. Gráfica comparativa de los perfiles de disolución de las drugmies impresas con F2 y F4.	217
Figura 4.6-15. Imágenes del proceso de disolución de las drugmies dentro del aparato USP-II. Imágenes tomadas y cedidas por del departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.	218

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2.3-1. Composición del medio de cultivo MEM empleado.....	67
Tabla 2.3-2. Composición del medio de cultivo DMEM empleado.	67
Tabla 2.3-3. Composición de las partes de la formulación y ratios de mezcla.	69
Tabla 2.4-1. Ajuste de los valores experimentales a los modelos matemáticos seleccionados.....	76
Tabla 2.4-2. Disminución y recuperación de la viscosidad calculados a distintas etapas del ensayo.	77
Tabla 2.4-3. Valores de deformación crítica (γ_c) para las tintas biomateriales.	79
Tabla 2.4-4. Valores de umbral de fluencia (τ_0) obtenidos.	79
Tabla 2.5-1. Valores de G' y G'' al 1% de deformación (oscilación).	84
Tabla 2.6-1. Parámetros de impresión empleados en los modelos 3D para cultivo celular.	87
Tabla 2.6-2. Grosor de trazo (mm) a distintas velocidades para la tinta 1:1.....	87
Tabla 3.3-1. Composición de las tintas biomateriales de BCP.....	111
Tabla 3.4-1. Ajuste de los valores experimentales a los modelos matemáticos seleccionados.....	116
Tabla 3.4-2. Disminución y recuperación de la viscosidad (μ) calculados a 37 °C.	117
Tabla 3.4-3. Disminución y recuperación de la viscosidad (μ) calculados a temperatura ambiente.	119
Tabla 3.4-4. Valores de deformación crítica (γ_c) para las tintas biomateriales.	120
Tabla 3.4-5. Disminución y recuperación de la viscosidad (η^*) calculados a temperatura ambiente.	120
Tabla 3.6-1. Parámetros de impresión empleados en los distintos modelos 3D.	127
Tabla 3.6-2. Grosor del trazo (mm) en función de la velocidad de impresión.....	128

Tabla 3.8-1. Masa (g) de los cubos frescos sumergidos en PBS y SR% calculados.	138
Tabla 3.8-2. Masas (m) y alturas (h) iniciales y finales de los cubos impresos y deshidratados.	139
Tabla 4.3-1. Concentraciones de carragenato iota, almidón de patata y gelatina porcina utilizando un diseño factorial de 2 ⁴	157
Tabla 4.3-2. Diseño de la matriz experimental para las variables independientes carragenato iota, almidón de maíz, gelatina tipo A y goma xantana (%p/p).	158
Tabla 4.3-3. Materiales empleados para las fórmulas base.....	158
Tabla 4.3-4. Parámetros de impresión.	160
Tabla 4.3-5. Recopilación de resultados de las pruebas de impresión de las tintas.	161
Tabla 4.3-6. Dosis y pauta de administración oral del clorhidrato de ranitidina.....	167
Tabla 4.3-7. Matriz experimental para la generación de las tintas F1 – F4.....	171
Tabla 4.3-8. Composición detallada de las fórmulas F1 – F4.....	171
Tabla 4.4-1. Ajuste de los valores experimentales a los modelos matemáticos seleccionados.	174
Tabla 4.4-2. Disminución y recuperación de la viscosidad calculados a distintas etapas del ensayo.	176
Tabla 4.4-3. Valores de deformación crítica (γ_c) determinados para F1 – F4.	178
Tabla 4.4-4. Valores de umbral de frecuencia (τ_0) estimados para F1 – F4.	179
Tabla 4.5-1. Temperatura onset (T_{on}) y temperatura del pico seleccionmo (T_m) del clorhidrato de ranitidina, F2 y F4 a distintas velocidades de calentamiento.....	186
Tabla 4.6-1. Parámetros de impresión empleados en los distintos modelos de drugmies	190
Tabla 4.6-2. Grosor del trazo (mm) en función de la velocidad de impresión y del número de faldas.	191
Tabla 4.6-3. Formulario para cumplimentar en el ensayo de identificación de las drugmies	195
Tabla 4.6-4. Reporte de las características físicas y organolépticas de las drugmies de la tinta F1.....	196
Tabla 4.6-5. Reporte de las características físicas y organolépticas de las drugmies de F1 - F4.	198
Tabla 4.6-6. Dimensiones estimadas y reales de los cuatro modelos de drugmies impresos	200
Tabla 4.6-7. Porcentaje (%) de desvío establecido por la Farmacopea Europea.	201

Tabla 4.6-8. Masas individuales de las drugmies (F1), promedios y límites calculados.	202
Tabla 4.6-9. Calificación de la prueba para cada modelo 3D impreso con F1.	203
Tabla 4.6-10. Masas individuales de las drugmies (F2 – F4), promedios y límites calculados.	204
Tabla 4.6-11. Calificación de la prueba para cada modelo 3D impreso con una tinta diferente.	205
Tabla 4.6-12. Lectura de la absorbancia de las diluciones y curva de calibrado calculada.	207
Tabla 4.6-13. Contenido en ranitidina de las drugmies impresas con la fórmula F2.	209
Tabla 4.6-14. Contenido en ranitidina de las drugmies impresas con la fórmula F4.	210
Tabla 4.6-15. Cálculo del porcentaje de dosis sobre la dosis promedio para la valoración de la Uniformidad de Contenido.	211
Tabla 4.6-16. Absorbancias detectadas y porcentajes de ranitidina HCl liberada calculados para las drugmies fabricadas con la fórmula F2.	214
Tabla 4.6-17. Absorbancias detectadas y porcentajes de ranitidina HCl liberada calculados para las drugmies fabricadas con la fórmula F4.	215

Glosario

A

Autoportante:

Capacidad de soportar el peso del apilamiento sin sufrir deterioro de ciertos materiales o productos.

B

Biodisponibilidad:

Cantidad de fármaco y velocidad a la que llega en forma activa a la circulación sistémica; fracción de medicamento capaz de llegar al lugar de acción.

Biocompatibilidad:

Propiedad de algunos materiales que garantiza la ausencia de reacciones alérgicas, inmunitarias, y, en general perjudiciales, como consecuencia de la interacción, habitualmente por contacto, entre tejidos o células vivos y dicho material.

Bioimpresión o Bioimpresión 3D:

Nuevo concepto de biofabricación que utiliza el posicionamiento preciso de la impresión 3D para depositar capa a capa distintos tipos de materiales (biomateriales, factores de crecimiento, fármacos, células vivas...) y generar estructuras tridimensionales que mimeticen el comportamiento de órganos o tejidos vivos.

Biotinta:

Tintas biomateriales y/o biocompatibles que contienen células vivas en su formulación final.

C

Célula Peltier:

Bomba de calor activa de estado sólido que transfiere calor de un lado del dispositivo al otro, con consumo de energía eléctrica, dependiendo de la dirección de la corriente.

Chiller (Water chiller):

Tipo de máquina frigorífica cuyo cometido es enfriar un medio líquido, generalmente agua o glicol. En modo bomba de calor también puede servir para calentar ese líquido. La mayoría de los chiller usan refrigerante en un sistema de circuito cerrado para facilitar el intercambio de calor del agua donde el refrigerante se bombea a un lugar donde el calor residual se transfiere a la atmósfera.

Citocompatible:

Material o sustancia que no produce reacciones perjudiciales en uno o varios tipos celulares cuando interacciona con ellos.

D

Delaminación:

Separación de capas y pérdida de resistencia de una pieza en el eje Z, que puede producirse durante o después de la impresión, derivada de una mala adhesión de las capas de material entre sí.

E

Estereolitografía:

Proceso de fabricación aditiva que emplea un tanque de resina fotosensible y un láser ultravioleta para construir los objetos.

H

Humectabilidad:

Tendencia de un fluido a adherirse y extenderse sobre la superficie de un sólido.

M

Matriz extracelular:

Red grande de proteínas y otras moléculas que rodean, sostienen y dan estructura a las células y tejidos del cuerpo. La matriz extracelular ayuda a que las células se unan y se comuniquen con las células cercanas, y desempeña una función importante en la multiplicación celular, el movimiento y otras funciones celulares. También participa en la reparación del tejido dañado. También se llama matriz intercelular, matriz intersticial y MEC o ECM.

Medicamentos de estrecho margen terapéutico:

Fármacos en los que la relación entre la dosis que produce efecto terapéutico y la que provoca efecto tóxico es muy estrecha, requiriendo en muchos casos de un monitoreo y control constante de los niveles en el paciente.

Motor paso a paso:

Dispositivo electromecánico que convierte una serie de pulsos eléctricos en desplazamientos angulares, lo que significa que es capaz de girar una cantidad de grados (paso o medio paso) dependiendo de sus entradas de control. Los motores paso a paso son ideales para la construcción de mecanismos en donde se requieren movimientos muy precisos.

O

Osmolaridad:

Concentración de las partículas osmóticamente activas contenidas en una disolución, expresada en osmoles o en miliosmoles por litro de disolvente.

Osteoconducción:

Proceso por el cual el material provee un ambiente, estructura o material físico apropiado para la aposición de hueso nuevo.

Osteogénesis:

Proceso a través del cual ocurre la formación del tejido óseo.

Osteoinducción:

Proceso que estimula la osteogénesis, por el que las células madre son reclutadas en la zona receptora y a su alrededor para diferenciarse en condroblastos y osteoblastos, células específicas del tejido óseo para su formación *de novo*.

T**Tinta biomaterial:**

Combinación de biomateriales apta para la vehiculación de células y otros componentes biológicos, bioquímicos o farmacológicos, empleada en la bioimpresión de estructuras tridimensionales.

R**Reómetro:**

Equipamiento de laboratorio utilizado para medir la manera en la que un líquido, una mezcla o una suspensión fluye bajo la aplicación de fuerzas externas. La ventaja principal del reómetro es que es capaz de someter al fluido que se está analizando a variados tipos de deformaciones a la vez que mide los esfuerzos, y viceversa.

V**Varilla roscada:**

Barras que son roscadas en ambos extremos o a lo largo de toda su longitud. La rosca de una varilla puede seguir diferentes direcciones, a la derecha, a la izquierda o en ambas direcciones. Cuando no se especifica la dirección de la rosca, la dirección predeterminada es por lo general a la derecha.

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AEP	Asociación Española de Pediatría.
AM	del inglés, <i>Additive Manufacturing</i> ; fabricación aditiva. Sinónimo de Impresión 3D.
API	del inglés, <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> ; principio activo.
ASTM	del inglés, <i>American Society for Testing and Materials</i> ; siglas de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales.
BCP	del inglés, <i>Biphasic Calcium Phosphate</i> ; fosfato cálcico bifásico.
CAD	del inglés, <i>Computer-Aided Design</i> ; diseño asistido por ordenador.
DMEM	del inglés, <i>Dulbecco's modified medium</i> ; medio Eagle modificado de Dulbecco.
DSC	del inglés, <i>Differential Scanning Calorimetry</i> ; Calorimetría de barrido diferencial.
ECM	del inglés, <i>Extracellular Matrix</i> ; Matriz extracelular (sinónimo de MEC).
EDTA	del inglés, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; Ácido etilendiaminatetraacético.
FBS	del inglés, <i>fetal bovine serum</i> . Suero fetal bovino.
FDM	del inglés, <i>Fused Deposition Modelling</i> ; modelado por deposición fundido.
FFF	del inglés, <i>Fusion Filament Fabrication</i> ; sinónimo de FDM.
FINBA	Fundación para la Investigación y la Innovación Biosanitaria de Asturias.
FRESH	del inglés, <i>Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels</i> ; incrustación de forma libre y reversible de hidrogeles suspendidos.
GFP	del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i> ; proteína verde fluorescente.
GUI	del inglés, <i>Graphical User Interface</i> ; interfaz gráfica de usuario.
HA	Hidroxiapatita.
HC	del inglés, <i>Honeycomb</i> ; patrón de relleno tipo panal de abeja.

HEPES	del inglés, <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> ; Ácido 4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-iletanosulfónico.
ISO	del inglés, <i>International Organization for Standardization</i> ; Organización Internacional de Normalización.
LVR	del inglés, <i>Linear Viscoelastic Region</i> ; región viscoelástica lineal.
MEM	del inglés, <i>Minimum Essential Media</i> ; medio esencial mínimo.
MCS	del inglés, <i>multicellular spheroid</i> ; esferoide multicelular.
NVU	del inglés, <i>Neurovascular Unit</i> ; unidad neurovascular.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
Ph. Eur	Farmacopea Europea.
PLA	Ácido poliláctico.
qsp	Cantidad suficiente para. Abreviatura galénica.
RGD	Tripéptido de arginina-glicina-ácido aspártico.
rpm	Revoluciones por minuto.
SAOS	del inglés, <i>Small Amplitude Oscillatory Shear tests</i> ; ensayos viscoelásticos dinámicos de baja amplitud.
SD	del inglés, <i>Standard Deviation</i> ; desviación estándar.
SDM	del inglés, <i>Stepped Dynamic Method</i> .
SFM	del inglés, <i>Stepped Flow Method</i> .
SLA	del inglés, <i>stereolithography</i> ; estereolitografía.
SLS	del inglés, <i>Selective Laser Sintering</i> ; sinterizado selectivo por láser.
SR	del inglés, <i>Swelling Ratio</i> ; proporción de hinchamiento.
SSE	del inglés, <i>Semi-Solid Extrusion</i> ; extrusión de semisólidos.
STL	del inglés, <i>Stereolithography</i> ; archivo de estereolitografía.
TCAC	Tasa de crecimiento anual compuesto.
TCP	del inglés, <i>Tricalcium Phosphate</i> ; fosfato tricálcico.
TNT	del inglés, <i>Tunneling Nanotube</i> .
USP	del inglés, <i>United States Pharmacopeia</i> ; Farmacopea Estadounidense.
UUD	Uniformidad de Unidades de Dosificación.
XRPD	del inglés, <i>X-Ray Powder Diffraction</i> ; difracción de rayos X de polvo.
ZBH	del inglés, <i>Zero Background Holder</i> ; portamuestras de fondo cero.

Lista de Símbolos

$\dot{\gamma}$	velocidad de corte o de cizallamiento; [s^{-1}]
γ_c	límite de linealidad o punto de deformación crítica; [s^{-1}]
η^*	viscosidad compleja; [Pa·s]
η_{med}	viscosidad del medio; [Pa·s]
λ_{max}	la longitud de onda en la cual se produce el máximo de absorbancia en el espectro; [nm]
μ	viscosidad aparente (también se expresa como η); [Pa·s]
μ_B	viscosidad aparente calculada con el modelo de Bingham; [Pa·s]
μ_C	viscosidad aparente calculada con el modelo de Casson; [Pa·s]
μ_∞	viscosidad newtoniana a velocidad de cizallamiento infinita; [Pa·s]
τ	esfuerzo cortante (también se expresa como σ); [Pa]
τ_0	umbral de fluencia o esfuerzo cortante umbral; [Pa]
ϕ	fracción sólida
ϕ_{max}	fracción sólida máxima
G'	módulo elástico o de almacenamiento [Pa]
G''	módulo viscoso o de pérdidas [Pa]
K	índice de consistencia (también se expresa como m); [Pa·s ⁿ]
n	índice de flujo

Capítulo 1.

Introducción y consideraciones teóricas de la impresión 3D

1.1. Impresión 3D: historia y evolución

Bajo el nombre de impresión 3D se encuentra un grupo de tecnologías de fabricación que permiten manipular de manera automática distintos materiales —en ocasiones llamados “tintas”— y agregarlos capa a capa para construir un objeto tridimensional a partir de un modelo digital. Las técnicas de impresión 3D también se conocen como fabricación aditiva (del inglés *Additive Manufacturing*, AM) porque, a diferencia de los métodos de fabricación convencionales basados en introducir material fundido en un molde o fresar una forma a partir un bloque de mayor tamaño, implican la construcción de objetos de abajo hacia arriba mediante deposiciones sucesivas de material. Con la capacidad de imprimir estructuras con alto nivel de complejidad y precisión, la libertad de diseño y personalización sin coste adicional o la minimización de residuos, estas tecnologías se han convertido en una herramienta única para muchos sectores.¹⁻³

La aparición de la impresión 3D se remonta a finales del siglo pasado. El 8 de agosto de 1984, Charles W. Hull presentó la patente de un aparato que, mediante un láser ultravioleta, escaneaba y solidificaba (o "curaba") una resina sensible a la luz.⁴ Describió así la estereolitografía (SLA) y, con ello, la primera impresora 3D del mundo. Dos años después, Hull cofundó 3D Systems, una de las empresas que sigue jugando un papel muy importante en la industria actual. La patente de Hull fue seguida de cerca por otras dos: la sinterización selectiva por láser a base de polvo (SLS; 1989) de Carl Deckard y el modelado por deposición fundida (FDM; 1989) de Scott Crump, cofundador de Stratasys, otra de las grandes empresas del sector hoy en día.⁵

La posterior aparición de empresas desarrolladoras de software 3D, como Materialise, permitió superar las limitaciones derivadas de la incapacidad de generar, almacenar y traducir eficientemente datos digitales tridimensionales complejos en archivos imprimibles en 3D. En ese periodo también se introdujeron nuevos procesos de impresión, como la proyección de aglutinante o *binder jetting* (1993, Z Corporation), la proyección de material o *material jetting* (1998, Objet) y la impresión 3D basada en extrusión directa, que Sandia National Laboratories acuñó como *Robocasting* en sus trabajos con materiales cerámicos.⁶ En resumen, en poco más de una década se crearon las distintas tecnologías de

fabricación aditiva que, vigentes a día de hoy, fueron la base de la llamada impresión 3D de “primera generación” y que serán descritas con detalle más adelante.

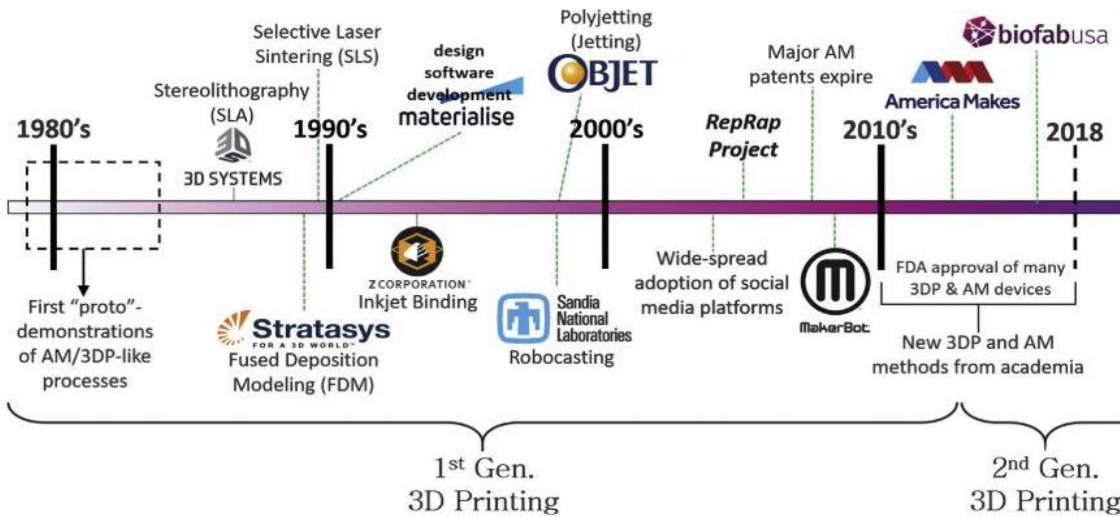


Figura 1.1-1. Hilo temporal con los eventos de mayor relevancia en la historia de la impresión 3D. Extraído y adaptado de (Jakus, 2019).

Sin embargo, la mayor revolución en la fabricación aditiva se produjo tras la expiración de las primeras patentes originales. El surgimiento y la adopción generalizada de las redes sociales y la fundación del Proyecto RepRap (una iniciativa de la Universidad de Bath (Reino Unido) para desarrollar una impresora 3D de bajo coste que pudiera imprimir la mayoría de sus propios componentes),^{7,8} junto con la aparición del software de código abierto y la creación de una comunidad (conocida popularmente como movimiento *maker*) para compartir archivos y conocimiento, produjeron el mayor acercamiento de la fabricación aditiva al ciudadano de a pie. En última instancia, hizo aparición la compañía MakerBot,⁹ posiblemente la primera gran empresa de impresión 3D centrada en el consumidor.

Con la tecnología recibiendo la atención total de la industria y la academia, los principales desarrollos se centraron en la creación de nuevas tintas y materiales avanzados, altamente funcionales e imprimibles en 3D, lo que dio paso a la llamada impresión 3D de “segunda generación”.⁵ A diferencia de las tecnologías de primera generación, que fueron mejoradas principalmente a través de avances en hardware y que empleaban materiales inertes bien establecidos, las tecnologías de impresión 3D de segunda generación se caracterizaron por contar con robótica avanzada e imágenes tridimensionales mejoradas, así como con el desarrollo e introducción de nuevos materiales altamente biofuncionales (hidrogeles,

polímeros biocompatibles...) o el manejo de material biológico (células, factores de crecimiento, elementos de la matriz extracelular...)¹⁰⁻¹³

Emergió así la bioimpresión 3D (*3D bioprinting*, en inglés), un nuevo concepto que utiliza el posicionamiento preciso capa a capa de estos materiales para fabricar estructuras tridimensionales que mimeticen el comportamiento de órganos o tejidos vivos (Figura 1.1-2), desempeñando un papel fundamental en la investigación y el tratamiento de patologías, la medicina regenerativa o la ingeniería de tejidos.¹⁴⁻¹⁶ Del mismo modo, el continuo desarrollo de estos materiales de impresión o tintas está dando lugar a la generación de nuevos métodos y aplicaciones de la impresión 3D,^{17,18} como la fabricación de sensores y elementos de diagnóstico específicos,¹⁹⁻²¹ el almacenamiento de energía^{22,23} o la impresión 4D,²⁴⁻²⁷ concepto basado en la fabricación de estructuras dinámicas con formas, propiedades o funcionalidades ajustables y/o que respondan a estímulos externos una vez impresas.

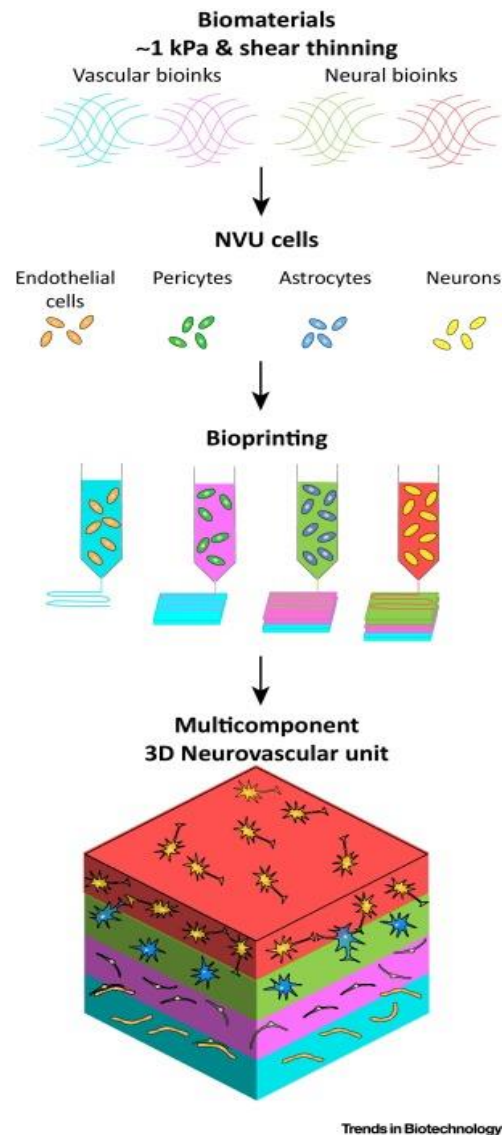


Figura 1.1-2. Esquema de la combinación de diferentes biomateriales y tipos celulares para generar un modelo 3D complejo. Extraído de (Potjewyd et al., 2016).

De esta manera se puede comprobar como en los 37 años transcurridos desde que Hull presentó su patente, la impresión 3D ha sido adoptada de forma exponencial en numerosas industrias, de tal modo que el pronóstico de ingresos para todos los productos y servicios de AM en todo el mundo había sido tasado según el *Wohlers Report 2019* en 15,8 billones de dólares americanos para 2020, y se espera que la continua expansión de la impresión 3D aumente esos ingresos a casi 24 billones de dólares americanos en 2022,

y más de 35 billones en 2024.²⁸ A su vez, se calcula que el mercado de materiales de impresión 3D crecerá de 1,5 billones de dólares americanos en 2019 a 4.5 billones en 2024 (Figura 1.1-3), a una tasa de crecimiento anual compuesto (TCAC) del 25% entre 2019 y 2024.

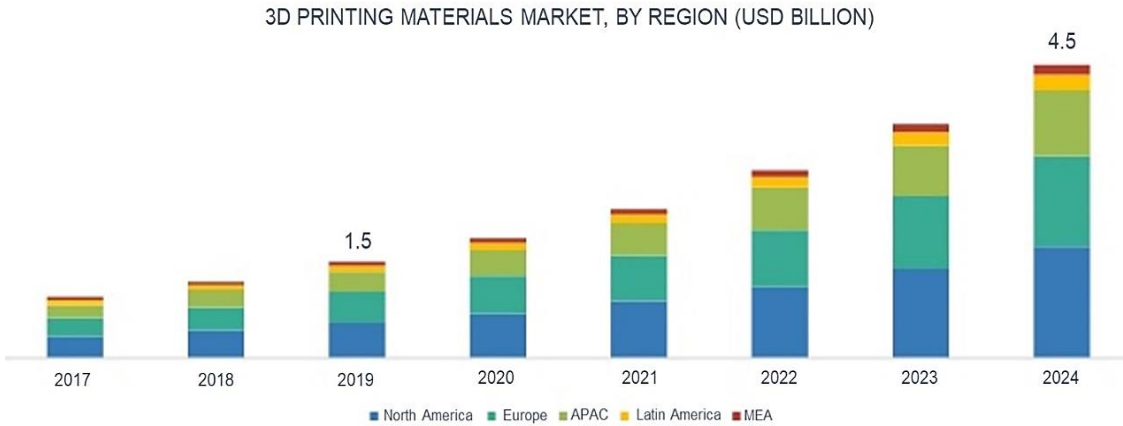


Figura 1.1-3. Expectativas de crecimiento para el mercado de materiales por región. Extraído de (Markets and Markets, 2020).

Esta estimación de crecimiento en el mercado de los materiales viene marcada por la alta demanda que presentan sectores clave como son el aeroespacial, el transporte, la defensa, o la salud y la medicina.²⁹ Por ello, el desarrollo de nuevas formulaciones de tintas debe ser considerado como un factor fundamental en la consecución de un avance definitivo del conjunto de las tecnologías de fabricación aditiva.

1.2. Tecnologías de fabricación aditiva

A consecuencia de la rápida evolución de las distintas tecnologías de fabricación aditiva y de la continua aparición de nuevas vertientes en periodos de tiempo muy cortos, se han ido utilizando términos y definiciones a menudo referidos a áreas de aplicación específicas y/o a marcas registradas que resultan, con frecuencia, ambiguos y confusos.

Con el propósito de facilitar la comprensión y la comunicación entre colaboradores, y de fomentar la aplicación de la fabricación aditiva,³⁰⁻³² la Organización Internacional de Estandarización (del inglés, *International Organization for Standardization*, ISO) y la American Society for Testing and Materials (más conocida como ASTM International), publicaron en 2015 los únicos estándares disponibles a fecha de hoy en el campo de la fabricación aditiva, entre los que destacan la norma ISO/ASTM 52900, que estandariza toda la terminología, y la norma ISO 17296-2, que clasifica y define las diferentes metodologías de impresión 3D. Se distinguen un total de siete tecnologías comercialmente disponibles;³³ sin embargo, en la presente Tesis no se detallarán dos de ellas —laminación de hojas y deposición de energía dirigida— por su menor viabilidad y utilidad en el mercado actual. Las cinco tecnologías más empleadas se describen a continuación:

a) Fotopolimerización en tanque o cuba.

La fotopolimerización es un proceso de fabricación aditiva en el que un polímero líquido se cura o solidifica selectivamente, en una cuba, a través de reacciones de polimerización activadas por luz.

El rayo láser barre la superficie de la resina líquida de acuerdo con el modelo 3D digital suministrado a la impresora, generando las distintas capas a medida que la plataforma se va moviendo (Figura 1.2-1). En esta categoría se encuentra la mencionada estereolitografía (SLA), que tiene una precisión y resolución extremadamente altas y es considerablemente rápida en comparación con otras tecnologías de impresión. Sin embargo, suele requerir la generación de soportes auxiliares que deben ser retirados del modelo de forma manual, siendo además difícil de adaptar a ciertos sectores y

aproximaciones como la bioimpresión, debido al número limitado de materiales biocompatibles disponibles y a la citotoxicidad de ciertas resinas fotosensibles.³⁴⁻³⁹

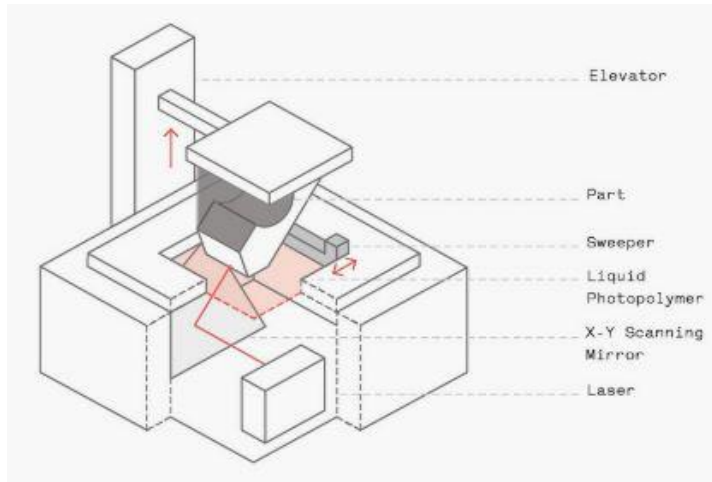


Figura 1.2-1. Esquema de una impresora de fotopolimerización en tanque o cuba. Extraído de (Redwood et al., 2017).

b) Proyección de material.

Al igual que el proceso de SLA, esta tecnología se basa en el principio de la fotopolimerización. El cabezal de impresión, que es muy similar al de una impresora de inyección de tinta, emite cientos de pequeñas gotas de resina del fotopolímero, que se depositan de forma selectiva en la plataforma (Figura 1.2-2). La resina se cura posteriormente con luz UV integrada en el cabezal de impresión para formar la capa.^{40,41}

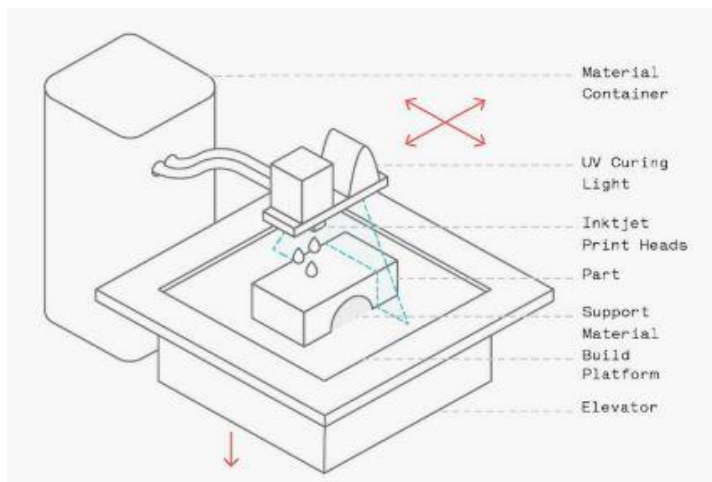


Figura 1.2-2. Esquema de una impresora de proyección de material. Extraído de (Redwood et al., 2017).

La mayor ventaja de esta tecnología es su capacidad para imprimir con múltiples materiales a todo color, resultando muy útil para crear prototipos detallados con alta resolución de forma relativamente económica y con poco gasto de tiempo, aunque el volumen de construcción sea muy reducido. Las principales desventajas de la tecnología coinciden con las propias de la SLA: el uso de soportes que conllevan etapas de postprocesado que pueden perjudicar a la pieza final y la prácticamente nula biocompatibilidad de los materiales disponibles.³⁹

c) Proyección de aglutinante.

Este proceso de fabricación aditiva se basa en la deposición selectiva de un agente líquido aglutinante sobre un lecho de polvo, que luego solidifica en sección transversal (Figura 1.2-3).

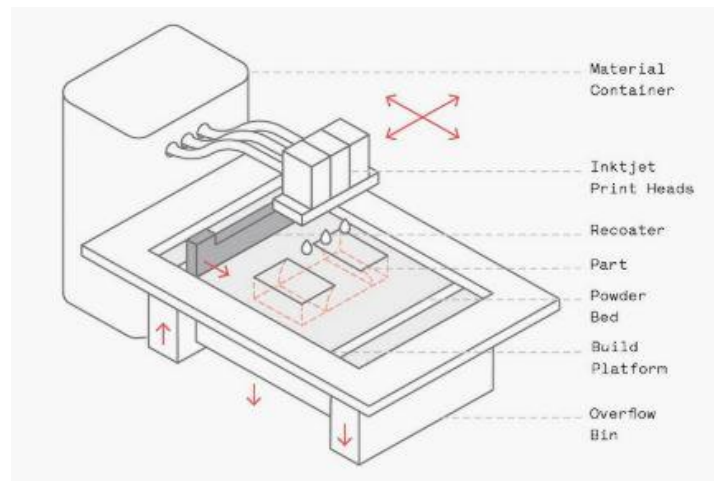


Figura 1.2-3. Esquema de una impresora de proyección de aglutinante. Extraído de (Redwood et al., 2017).

Yeso, arena, cerámicas, metales y polímeros en gránulos son los materiales más empleados.^{30,42} Esta tecnología también requiere de etapas de postprocesado: liberar las piezas del encapsulamiento de polvo, curarlas para aumentar su resistencia y eliminar los restos de material con cepillos o aire comprimido, entre otras.

d) Fusión de lecho de polvo.

En este tipo de impresoras, se funden selectivamente ciertas zonas de un lecho de polvo mediante un láser o un haz de electrones para formar una pieza (Figura 1.2-4). Se emplean mecanismos para aplicar y alisar el polvo a medida que se construye la pieza, la cual queda enterrada en el material al finalizar el proceso de impresión.^{30,43} La fusión de lecho de polvo utiliza polvos poliméricos (nailon, poliamidas...) o polvos metálicos para diseñar piezas

complejas o con geometrías muy elaboradas y bajo peso final, motivo por el cual es la tecnología de preferencia en el sector aeroespacial y automotriz. Muy a menudo se emplean aleaciones como acero inoxidable, cobalto-cromo, aluminio o titanio. También se pueden utilizar algunos metales preciosos (oro, platino, plata), casi exclusivamente en el sector de la joyería.^{43,44}

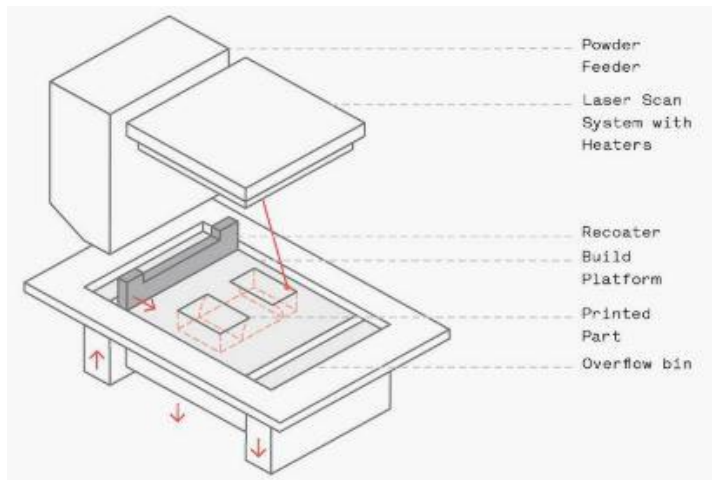


Figura 1.2-4. Esquema de una impresora de fusión de lecho de polvo. Extraído de (Redwood et al., 2017).

e) Extrusión de material.

En esta categoría se encuentran todos los procesos de fabricación aditiva en los que, de forma general, el material se dispensa a través de una boquilla o un orificio y se genera la figura diseñada mediante los movimientos del cabezal de impresión.

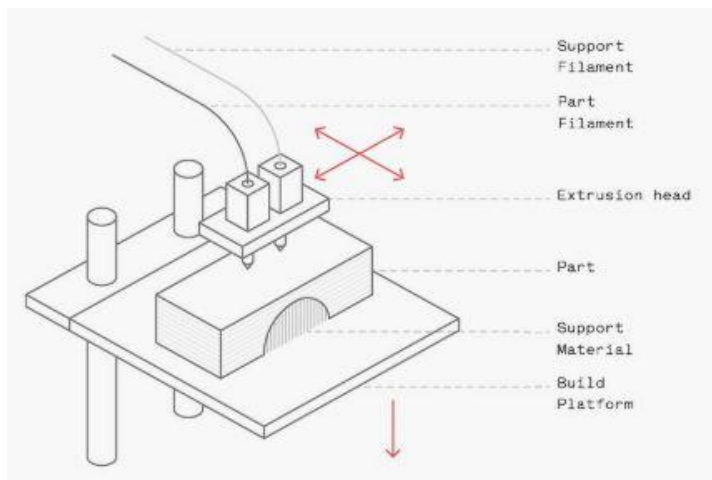


Figura 1.2-5. Esquema de una impresora de fabricación con filamento fundido (FFF). Extraído de (Redwood et al., 2017).

La tecnología de extrusión de material más común es la fabricación con filamento fundido o FFF (más comúnmente conocido como modelado por deposición fundida o FDM, un término registrado por su creador, la empresa Stratasys). En FDM se imprime utilizando filamento termoplástico sólido, el cual es empujado a través de una boquilla a alta temperatura que lo derrite en el proceso. La impresora deposita el material, con una ruta predeterminada, sobre una plataforma de impresión donde el filamento se enfría y solidifica para formar una parte de la pieza (Figura 1.2-5).^{30,44}

Residiendo también bajo el término general de extrusión de material se encuentra la extrusión de semisólidos (del inglés *semi-solid extrusion*, SSE), un método de impresión 3D que, tal y como su nombre indica, se basa en la deposición de materiales semisólidos (como geles o pastas) en capas secuenciales que solidifican para crear un objeto final.^{17,45,46} La naturaleza física de los materiales permite que se impriman a bajas temperaturas y por ello, esta tecnología ha sido ampliamente acogida en el campo de la bioimpresión, pues posibilita la deposición de células vivas y otros componentes biológicos sensibles a las altas temperaturas.^{47,48} Además, gracias a la versatilidad de esta tecnología, mediante SSE también se han impreso una gran variedad de productos, tanto alimenticios (purés, chocolates, geles de pescado...),^{49,50} como cerámicos,^{22,51} hormigones,^{52,53} o productos sanitarios y farmacéuticos de distinta índole (implantes, formas galénicas para dosificar fármacos...),^{45,54} haciendo de ella una de las tecnologías más utilizadas en la investigación actual y, por ende, en el ámbito comercial.

Un ejemplo de la versatilidad de la extrusión de semisólidos fue la realización de mi Trabajo Final de Máster donde se inició la investigación basada en la impresión 3D de formas farmacéuticas personalizadas a partir de medicamentos comerciales en polvo mediante el uso de agentes texturizantes.⁵⁵ Dando continuidad a dichos trabajos, a lo largo de la presente Tesis se llevará a cabo la formulación y caracterización de distintas tintas biomateriales, capaces de ser utilizadas por tecnologías SSE en la aplicación a diferentes investigaciones científico-sanitarias de interés.

1.3. Funcionamiento y manejo de una impresora 3D de extrusión de semisólidos

Si bien es cierto que existen diferentes tecnologías de fabricación aditiva y, por ende, diversas formas de producir una pieza, todas tienen en común una serie de etapas que conforman de forma general el proceso de impresión 3D (Figura 1.3-1).



Figura 1.3-1. Etapas generales del proceso de impresión 3D.

La primera de las etapas consiste en obtener el modelo 3D con el diseño de la pieza que se pretende imprimir, ya sea creándolo específicamente para el proyecto a realizar, o bien utilizando alguno de los diseños ya existentes en librerías de archivos en línea. Con el modelo 3D seleccionado, el siguiente paso se basa en el uso de programas de laminado (conocidos como *slicers*) para generar un archivo G-code, es decir, un fichero con formato específico que contiene los comandos que la impresora lee y ejecuta para formar la pieza. Una vez obtenido el G-code correcto, se configura y prepara la impresora para que pueda iniciar la etapa de impresión propiamente dicha. Cuando la impresión concluye, y si los materiales empleados lo requieren, se realizan trabajos de retirada y postprocesado (eliminación de soportes, pulido, curado, aspirado...) para obtener así la pieza final.

Conocer las distintas etapas del proceso de impresión, así como el funcionamiento del equipo y el software implicado, es una parte imprescindible en el uso de estas tecnologías de fabricación, ya que las características finales del producto obtenido dependerán de ello y no exclusivamente de la naturaleza de la tinta o de sus características.⁵⁶

Es conveniente remarcar que, sobre todo en el caso de la SSE, una impresión fallida no implica necesariamente una tinta inadecuada. El problema puede residir en una mala configuración del programa de laminado (velocidades o alturas de capa incorrectas...) o de la impresora (por ejemplo, un mal ajuste de temperaturas en el equipo puede producir una deposición descontrolada del material), o al uso de un modelo 3D inadecuado (poca resolución, tamaños de archivo excesivos...). Por lo tanto, aunque es requisito comprender las propiedades del material a emplear, no sería apropiado valorar la adecuación o la imprimibilidad de una tinta sin tener un conocimiento suficiente sobre el resto de las variables que pueden llevar al éxito o al fracaso en la impresión de semisólidos. Por este motivo, tanto el equipo utilizado, como las distintas etapas del proceso de impresión, sus puntos críticos y sus opciones de configuración, son detallados a lo largo de este capítulo.

1.3.1. Descripción de la impresora bIDO-I

Todos los trabajos de impresión 3D contenidos en esta Tesis se han realizado empleando la impresora de extrusión de semisólidos bIDO-I (Figura 1.3-2). Este equipo, ha sido desarrollado de forma íntegra (diseño, ingeniería, hardware y software de control) por IDONIAL, centro tecnológico con elevada experiencia en tecnologías de fabricación avanzada y de impresión 3D.

Estructuralmente, se trata de una impresora de configuración cartesiana, es decir, que posee un eje X, un eje Y, y uno Z, para el movimiento de izquierda a derecha, de adelante hacia atrás, y de abajo hacia arriba, respectivamente. Este modelo consta de tres cabezales (o extrusores) individuales incluidos en un soporte móvil que se desplaza en los tres ejes. Cada extrusor cuenta con un sistema integrado para el control de la temperatura individual, a base de células Peltier. La base de impresión también está termorregulada, pero en este caso mediante circulación de líquido externo a través de un chiller.

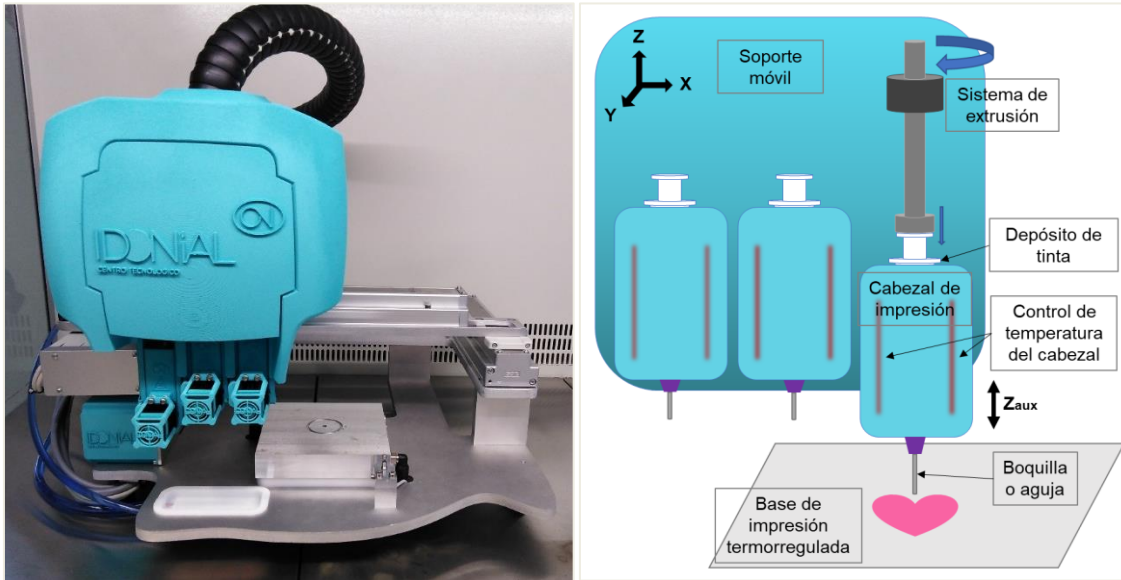


Figura 1.3-2. Fotografía (izda.) y esquema de las distintas partes (dcha.) de la impresora bIDO-I.

A diferencia de otros equipos comerciales existentes, la base de impresión de bIDO-I es fija, siendo el cabezal el que se desplaza en el eje Z a medida que se va construyendo la pieza. Se evitan, así, fallos en la pieza final derivados de la inestabilidad de la base o de las vibraciones causadas por el movimiento del cabezal. Este prototipo consta, además, de unos ejes Z auxiliares (Z_{aux}) para cada extrusor que permiten moverlo de forma individual en ese eje. En otras palabras, el eje Z controla el movimiento de todo el soporte, y el Z_{aux} , el de cada extrusor. Esto hace que únicamente el extrusor seleccionado se encuentre cerca de la base de impresión; el resto se encuentran retraídos en reposo y, de ese modo, se evitan choques accidentales con la figura que se está imprimiendo. Además, los ejes Z_{aux} posibilitan el uso de soportes de impresión con bordes altos, tales como placas de Petri o multipocillo, pues el soporte se desplaza siempre con los tres extrusores retraídos y, una vez llega a la posición de impresión y se selecciona el cabezal determinado, éste baja hasta la posición configurada y empieza la impresión.

El sistema de extrusión que utiliza bIDO-I se denomina extrusión a base de jeringa (*syringe-based extrusion*, en inglés) y consiste en el accionamiento del émbolo de la jeringa mediante un motor paso a paso programado, que genera un movimiento lineal de la varilla roscada, y empuja así la tinta hacia el exterior (Figura 1.3-3). A diferencia de otros sistemas SSE, como la extrusión impulsada por presión de aire o la extrusión mediada por tornillo sin fin, la unidad de extrusión a base de jeringa es adecuada para imprimir materiales con alta viscosidad y resistencia mecánica, por lo que puede usarse para fabricar estructuras

3D complejas con alta resolución prácticamente con todo tipo de materiales,⁵⁶⁻⁵⁸ desde hidrogeles débiles, hasta pastas cementosas.

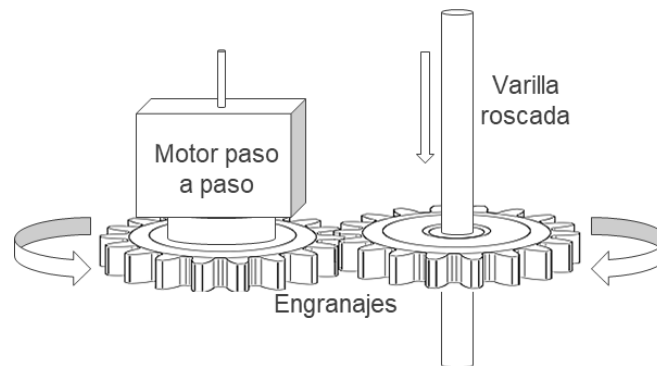


Figura 1.3-3. Diagrama del sistema de extrusión que muestra el motor paso a paso, los engranajes y la varilla roscada que presionará el émbolo de la jeringa.

Con este sistema de extrusión y la configuración correcta de los parámetros del programa de laminado, se consiguen controlar de forma independiente la velocidad de movimiento del cabezal y la velocidad de extrusión. Esta última, además, se puede ajustar variando la velocidad de rotación del motor paso a paso para conseguir un mayor o menor flujo de material.^{46,59}

Habiendo descrito el funcionamiento mecánico del equipo, queda pendiente comprender cómo la impresora interpreta los comandos contenidos en los archivos generados con los programas de laminado (G-code), y de ese modo saber qué parámetros modificar a través del software cuando se obtiene una extrusión incorrecta o una figura con defectos. Esta relación impresora-G-code se detallará más adelante en la sección sobre programas de laminado.

1.3.2. Creación del modelo 3D y obtención del archivo STL

La obtención de un modelo tridimensional es la primera de las etapas de un proceso de impresión 3D. El método más común para la producción de estos modelos es el diseño asistido por ordenador o CAD (del inglés, *Computer-Aided Design*), aunque también puede utilizarse la ingeniería inversa en la generación de un modelo digital a través del escaneo 3D de un objeto físico. Sin embargo, para poder imprimir una pieza en 3D se requiere, primeramente, pasar el citado modelo CAD a un formato/lenguaje que la impresora 3D pueda interpretar. Así pues, este modelo es convertido o exportado a un archivo STL

(siglas provenientes del inglés, *Stereolithography*), el cual define la geometría de objetos 3D, excluyendo información como el color, texturas o propiedades físicas que sí incluyen otros formatos CAD. El STL es el tipo de archivo estándar de la industria para la impresión 3D; OBJ o AMF también son tipos de archivo aceptados, pero menos comunes.^{30,60,61} El formato de archivo STL utiliza una serie de triángulos asociados para recrear la geometría de la superficie de un modelo sólido. Cuando aumenta la resolución, se utilizan más triángulos (aproximándose mejor a las superficies del modelo 3D), pero también se aumenta el tamaño del archivo STL (Figura 1.3-4).



Figura 1.3-4. Esfera representada en tres resoluciones diferentes. Extraído y adaptado de (Giang, 2019).

Si la transformación del CAD a STL se lleva a cabo con una resolución demasiado baja, el modelo tendrá triángulos visibles en su superficie cuando se imprima, lo cual puede ser no deseado. Por el contrario, tampoco se recomienda aumentar la resolución por encima de cierto nivel, ya que no aporta ningún beneficio adicional: los detalles excesivamente finos no se pueden imprimir y el tamaño del archivo se incrementará innecesariamente, haciéndolo más difícil de manejar y procesar.⁶¹

Para que se realice una ejecución fiable del diseño y de la fabricación, el tipo de archivo, los datos adjuntos y el formato de dichos datos son de vital importancia, sobre todo en los casos en los que el diseñador y el fabricante son personas o entidades distintas. Tal es así, que existe una parte de la Norma ISO 17296 (concretamente, la Norma 17296-4) específica para todas las consideraciones que se aplican en el intercambio de información para la fabricación aditiva y que contiene la descripción del flujo de datos en el proceso de impresión 3D, de los formatos de archivos actuales, etc.⁶⁰

Existe una amplia gama de software CAD (Solidworks, Autodesk AutoCAD, Rhinoceros...) que permiten diseñar un modelo y exportarlo como un archivo STL de forma sencilla; así como plataformas de diseño gratuitas (Autodesk TinkerCAD), y portales web (Thingiverse,

Cults, Free3D, Yeggi...) donde la comunidad *maker* sube sus creaciones y las comparte con el resto de los usuarios, la mayoría bajo licencia Creative Commons.⁶²⁻⁶⁴ Estas bibliotecas de archivos STL resultan de gran utilidad para las personas que se inician en el mundo de la impresión 3D y no tienen conocimientos en diseño CAD, pero es cierto que la mayoría de las piezas que se encuentran en ellas están diseñadas para su uso en FDM o SLA, y pueden requerir ajustes para poder ser utilizadas en SSE.

Para la realización de la presente Tesis se utilizarán distintos modelos STL durante las pruebas de impresión de las formulaciones desarrolladas. La mayoría de estos modelos 3D, al tratarse de figuras sencillas, han sido creados mediante la herramienta Autodesk TinkerCAD. En algunos casos, han sido utilizados modelos 3D descargados de Thingiverse, de modo que se especificará la procedencia del archivo en cada apartado correspondiente.

1.3.3. Programas de laminado y archivos G-code

Una vez conseguido el archivo STL del correspondiente modelo 3D, este es importado a un programa de laminado el cual, tal y como su propio nombre indica, divide el diseño en muchas capas horizontales que se utilizarán para construir la pieza. Línea por línea, y capa por capa, el software de laminado 3D o *slicer* crea una trayectoria —más o menos “inteligente”— basada en la geometría del archivo STL, y genera los soportes de material, en caso de ser necesarios, en las zonas con voladizos o riesgo de colapso.

Tras analizar el archivo STL y aplicar las configuraciones y preferencias dictadas por el usuario, se crea un archivo G-code hecho a medida para la pieza a fabricar y la impresora 3D que se emplea. Este archivo G-code describe las coordenadas que determinan las trayectorias del cabezal, la temperatura de la cama y de la boquilla, la ventilación, la velocidad de impresión, y otras muchas variables.

Los programas de laminado a menudo son propiedad de cada marca de impresora 3D, aunque también existen programas universales y gratuitos, como Cura, Repetier o Slic3r.⁶⁵ Si se utiliza un buen software de laminado y unos parámetros de impresión ajustados correctamente, se pueden obtener resultados muy satisfactorios incluso con impresoras de bajo coste. En este sentido, el primer paso para configurar de forma correcta el programa de laminado está centrado en entender los distintos parámetros de impresión que se pueden modificar y el efecto o alcance en el proceso de impresión. Una vez

identificados los parámetros clave, es importante también conocer los comandos y la estructura del G-code para entender cómo el programa de laminado genera estos comandos y cómo la impresora los interpreta. Así, se adquiere la capacidad de detectar errores de configuración del *slicer* y reconocer códigos incorrectos que podrían dar fallos de lectura con una simple revisión del archivo; o bien se puede averiguar qué valores o comandos necesitan ser modificados para mejorar aspectos determinados de la pieza.

Para ayudar en la comprensión de los parámetros de impresión que son modificados desde el software de laminado, a continuación, se llevará a cabo una breve explicación sobre aquellos parámetros identificados como principales, siguiendo el orden en el que aparecen en el software Slic3r, que será el empleado para la obtención de G-codes en el desarrollo de la presente Tesis.

1.3.3.1. *Parámetros de impresión*

Configuración de capas y perímetros

a) Altura de capa (*layer height*)

Define la altura (en mm) que van a tener las capas de la pieza (Figura 1.3-5). En general, cuanto mayor es la altura de capa, peor resolución y definición tiene la figura final, pero, por otro lado, el tiempo de impresión es menor. El valor de la altura de capa nunca puede ser mayor que el diámetro de la boquilla seleccionada.

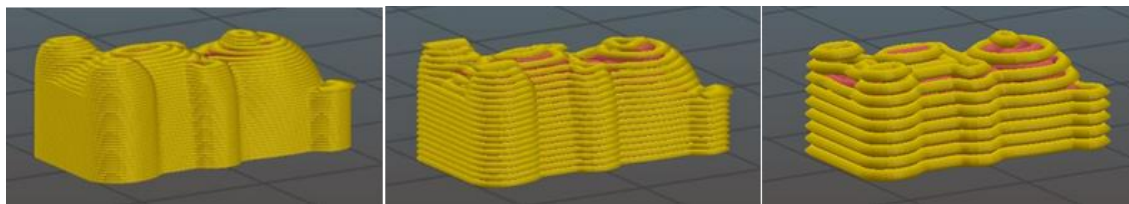


Figura 1.3-5. Previsualización en Slic3r de una misma figura con distintas alturas de capa (0,2mm; 0,4mm y 0,8mm respectivamente).

b) Altura de primera capa (*first layer height*)

Este parámetro configura la altura de la primera capa de la impresión y se expresa en % o en mm. Normalmente se suele dejar con el mismo valor de altura que el resto de las capas, aunque, en ocasiones, si se quiere mejorar la adherencia de la pieza a la base de impresión, es conveniente configurar una altura de primera capa menor.

c) Perímetros mínimos (*minimum perimeters*)

Los perímetros delimitan el contorno de las figuras, trazando un exterior preciso y aportando resistencia mecánica a la pieza. En este apartado se configura la cantidad de perímetros mínima que ha de tener la pieza según el usuario. Sin embargo, Slic3r puede aumentar este número si detecta que ejecutar el relleno de algunas zonas es difícil. Por defecto, se suelen establecer 2 o 3 perímetros mínimos (Figura 1.3-6).

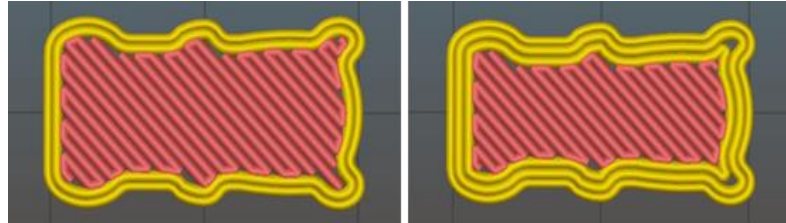


Figura 1.3-6. Previsualización en Slic3r de la primera capa de una figura con dos y tres perímetros, de izquierda a derecha.

d) Capas sólidas (*solid layers*)

En esta sección se selecciona el número de capas sólidas (macizas, con un relleno del 100%) que se desea que la pieza tenga. Permite determinar un número distinto en las capas inferiores (*bottom*) y las superiores (*top*). La función de estas capas sólidas es dar una base y acabado sólido y resistente.

Configuración del relleno de la pieza

a) Densidad de relleno (*fill density*)

En este parámetro se ha de introducir el porcentaje de relleno que deseamos. A menos porcentaje, menos material se consumirá y más rápida será la impresión, pero se obtendrán piezas más huecas y menos resistentes (Figura 1.3-7). Se recomienda trabajar con valores para este parámetro alrededor del 60% para la mayoría de las piezas. Para imprimir figuras completamente huecas, se utiliza una densidad de relleno del 0%, y para obtener piezas macizas o sólidas, del 100%.

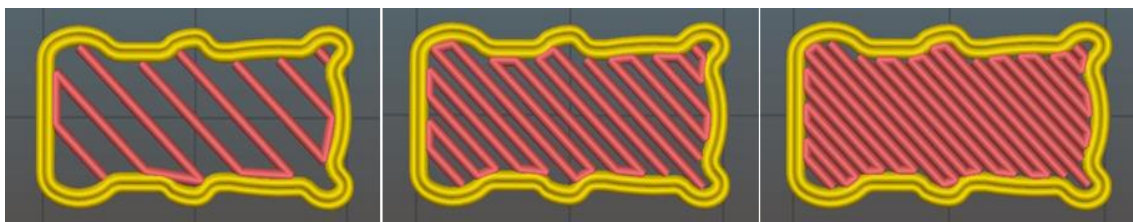


Figura 1.3-7. Previsualización en Slic3r de una capa con porcentajes de relleno equivalentes al 30%, 60% y 90%, de izquierda a derecha.

b) Patrón de relleno (*infill pattern*)

En esta parte se selecciona el tipo de relleno deseado para toda la pieza —a excepción de las capas superior e inferior, que tienen su propia opción de patrón de relleno—. Existen diferentes patrones de relleno: rectilíneos, en panal de abeja, concéntricos... con el fin de poder adaptar mejor el relleno a la forma de la pieza.

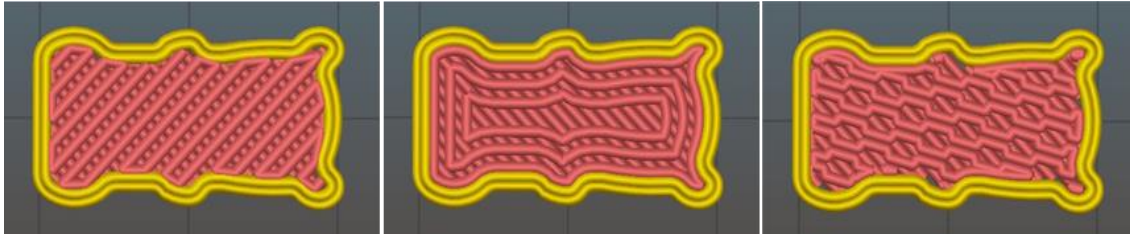


Figura 1.3-8. Previsualización en Slic3r de una figura con el mismo porcentaje de relleno (60%) pero con patrón rectilíneo, concéntrico, o panal de abeja (de izquierda a derecha, en ese orden).

c) Ángulo de relleno (*infill angle*)

El ángulo de relleno configura la disposición en la que se realizará el relleno de la pieza. De ese modo, si se introduce un valor de 45, el patrón de relleno trazará las líneas a 45°. Aunque la programación del software acepta casi cualquier valor, 45° es el valor óptimo.

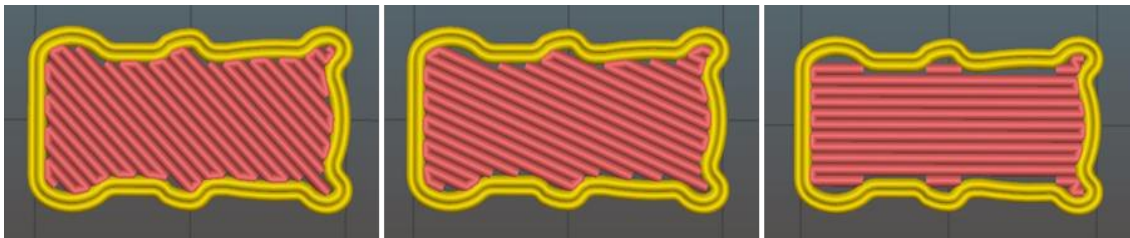


Figura 1.3-9. Previsualización en Slic3r de una capa con ángulo de relleno de 45°, 67° y 90° (de izquierda a derecha).

Configuración de faldas, brims y materiales de soporte.

a) Falda (*skirt*)

La falda es un contorno que rodea la pieza a imprimir, pero sin llegar a tocarla, y que se extruye en la cama de impresión antes de comenzar a imprimir el modelo. Las faldas tienen un propósito útil pues sirven para asegurar que el material fluye correctamente desde el extrusor y para eliminar posibles obturaciones de la boquilla antes de que empiece a imprimirse la figura (Figura 1.3-10A). También puede utilizarse para comprobar la calibración de la cama, observando si la aguja roza algún punto de la base de impresión o si, por el contrario, el extrusor está demasiado alto y el material no se deposita bien. Se

puede configurar el número de vueltas que componen la falda, la distancia del objeto a la que se imprime y la altura de esta.

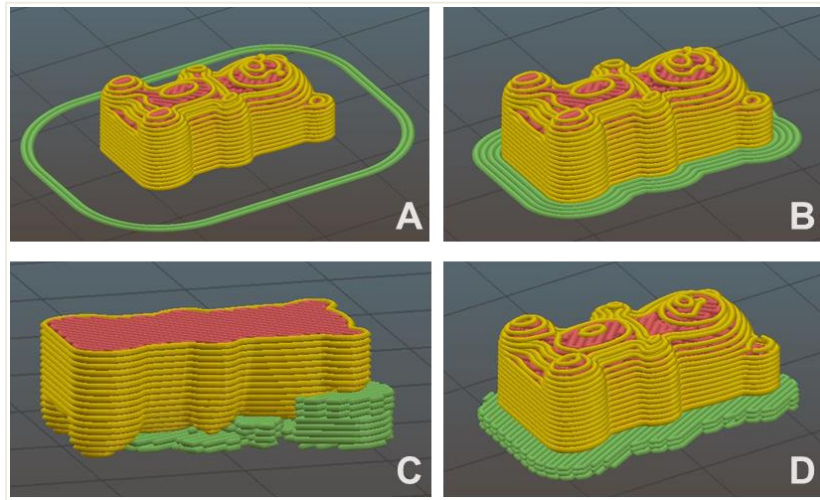


Figura 1.3-10. Previsualización en Slic3r de un mismo modelo 3D con skirt (A), brim (B), material de soporte (C) y raft (D).

b) Brim

Parámetro especial que crea un borde extra en las piezas para que no se despeguen de la base (Figura 1.3-10B). Este borde consiste en diversas líneas de material depositadas alrededor de la base del objeto, cada una más cercana que la anterior, hasta tocar el objeto.

c) Material de soporte

En este apartado se habilita la inclusión de estructuras de soporte. Con esta estructura adicional a la pieza, se posibilita la fabricación de figuras con voladizos o elementos flotantes (Figura 1.3-10C). El material de soporte deberá ser retirado cuando finalice la impresión.

d) Raft

El raft es un tipo específico de material de soporte. Formado por diversas capas, da lugar a una base separable sobre la que la figura reposará (Figura 1.3-10D). Se utiliza para nivelar mejor la superficie de construcción y evitar defectos derivados de posibles rugosidades en esta.

Configuración de la velocidad

La velocidad de movimiento de la boquilla es un factor importante que puede influir en la calidad de la impresión. Si bien una velocidad demasiado alta puede generar defectos en

la pieza o líneas discontinuas, una velocidad muy baja aumenta notablemente el tiempo de impresión.^{66,67}

a) Perímetros

En este apartado se configura la velocidad de impresión de los perímetros en mm/s. Para acabados superficiales óptimos, se recomiendan velocidades de perímetros inferiores.

b) Relleno

En este apartado se determina la velocidad de relleno en mm/s. Para piezas convencionales sin geometrías raras puede fijarse hasta un 150% de la velocidad de los perímetros.

c) Viaje

Este parámetro define la velocidad de traslado (mm/s) del cabezal de la máquina cuando no imprime, por ejemplo, al cambiar de capa o al recorrer la plataforma hasta el punto de inicio.

d) Velocidad de la primera capa

Este parámetro permite definir un % de velocidad para la primera capa. Esto es de utilidad para hacer que la primera capa vaya, por ejemplo, un 30% más lenta y asegurar así una mejor adhesión y un mejor “primer” acabado.

Configuraciones avanzadas: ancho de extrusión

Un parámetro que suele pasar bastante desapercibido en la comunidad *maker* y su trabajo con FDM, pero que requiere mención especial en la SSE, es el ancho de extrusión. Se entiende por ancho de extrusión (en inglés, *extrusion width*) al grosor del filamento de material extruido en el aire o por encima de una superficie (Figura 1.3-11.).

No debe confundirse y medirse como la distancia entre dos trayectorias adyacentes, ya que generalmente el programa de laminado aplicará cierta superposición entre esas trayectorias para obtener una mejor unión de los dos hilos de material.⁶⁸

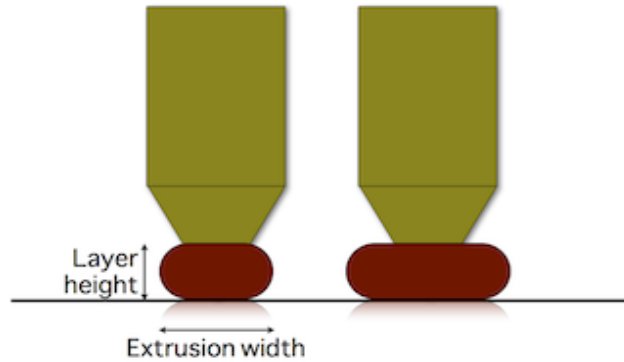


Figura 1.3-11. Distintos anchos de extrusión para una misma altura de capa. Extraído de (Slic3r.org).

Así pues, si dos trayectorias adyacentes están demasiado cerca o se extruye demasiado material, éstas se superpondrán en exceso. Por el contrario, si dos trayectorias adyacentes están demasiado distantes (o no se extruye suficiente material), se verán huecos en la pieza y/o se producirá delaminación debido a la falta de unión entre trazos (Figura 1.3-12). Del mismo modo, un mayor ancho de extrusión tendrá una mejor adhesión con la capa inferior y por ello, es aconsejable para piezas que requieran mayor resistencia mecánica. Sin embargo, con ese grosor de material no se podrán definir pequeños detalles o curvas estrechas con tanta resolución. Por el contrario, los trazos más delgados proporcionarán menos unión, pero una mejor precisión de forma.

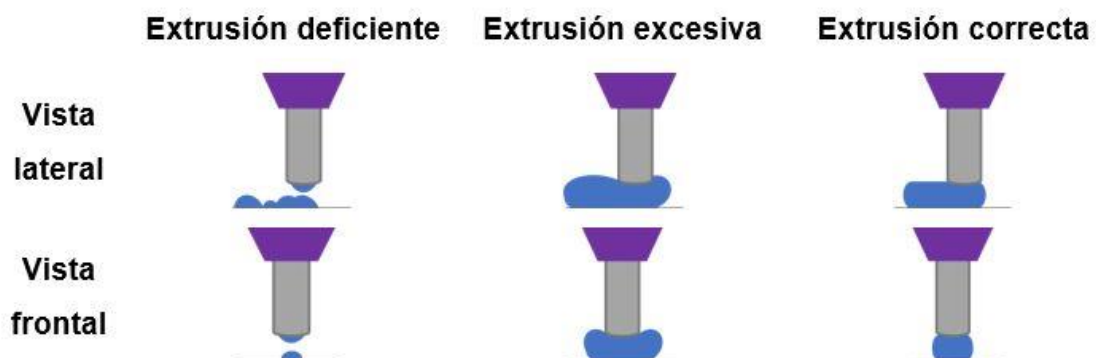


Figura 1.3-12. Representación de una extrusión deficiente, excesiva y correcta.

Para calcular el ancho de extrusión, de forma general, los programas de laminado asumen que la sección transversal de una extrusión equivale al área de un rectángulo con extremos semicirculares (Figura 1.3-13).⁶⁸

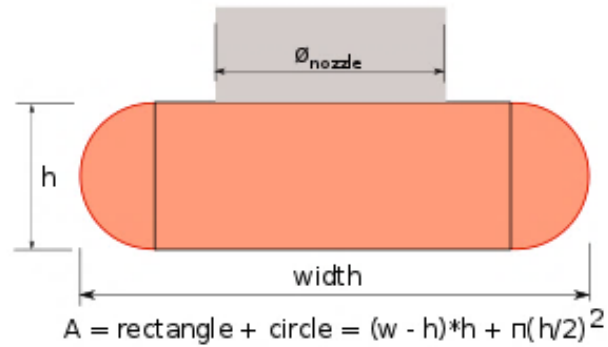


Figura 1.3-13. Fórmula de Slic3r para el cálculo del ancho de extrusión. Extraído de (Slic3r.org).

Esta aproximación, que puede llegar a cumplirse en el caso de los filamentos plásticos, es demasiado simplista y poco acertada en la extrusión de semisólidos. Dependiendo de su humectabilidad y su reología, este tipo de fluidos sufren procesos de difusión sobre la superficie de impresión, o entre las propias capas sucesivas, que impiden que se alcance la altura de capa (h) predeterminada (Figura 1.3-14).^{46,66,69} Por este motivo, la modificación manual del ancho de extrusión, mediante la variación de los parámetros específicos en el programa de laminado, es imprescindible a la hora de poder trabajar con fluidos o materiales semisólidos, como hidrogeles o pastas.

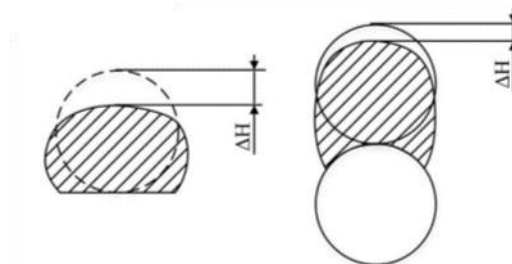


Figura 1.3-14. Esquema del proceso de difusión de un hidrogel sobre el soporte de impresión y entre capas sucesivas. Extraído y modificado de (He et al., 2016).

El valor del ancho de extrusión se puede cambiar directamente desde Slic3r y de forma individual para la primera capa, los perímetros, el relleno, o el material de soporte; o bien puede modificarse la extrusión general por defecto, afectando a todos los anchos de extrusión por igual. Los valores pueden introducirse en mm o en %, el cual se calculará en función de la altura de capa.

Desde un punto de vista práctico, la variación de este parámetro puede mejorar la ejecución del proceso de impresión y obtener así una figura mucho más satisfactoria. A modo de ejemplo, en la Figura 1.3-15, se puede observar cómo el aumento del ancho de

extrusión (150%) hace que la altura real de la capa impresa se ajuste con mayor exactitud a la altura de capa preestablecida y de ese modo, el fluido se deposite correctamente sobre la capa anterior y se genere un cilindro de diámetro regular. Sin embargo, con el ancho de extrusión calculado por defecto (dejando un valor de 0 en la configuración, que equivale al 100%) o con un aumento escaso del mismo (110%), el grosor de capa es insuficiente y las estructuras resultantes no reproducen el diseño cilíndrico.

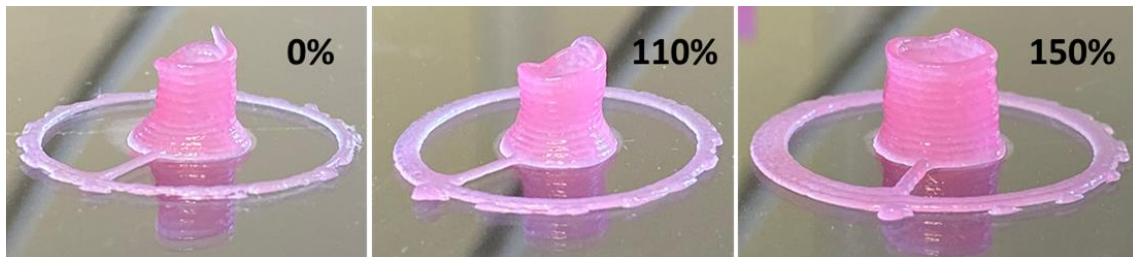


Figura 1.3-15. Modificación del ancho de extrusión para mejorar la consecución de forma.

1.3.3.2. Estructura básica del archivo G-code

Como ya se ha mencionado anteriormente, el archivo G-code es el encargado de indicarle a la impresora 3D a dónde moverse y cuánto material extruir en cada paso de la impresión 3D. Aunque los programas de laminado generan los G-code de forma automática y puede que haya usuarios que no interactúen con ellos, conocer el funcionamiento de este lenguaje puede ser muy útil a la hora de solucionar problemas en la impresión o para trabajar a un nivel más avanzado con la impresora 3D.^{70,71}

Un archivo G-code contiene gran cantidad información, y es exclusivo de la impresora para la que se ha creado, pues el conjunto de instrucciones que contiene se basa en la propia máquina (en sus dimensiones, en su configuración, en el lenguaje de programación utilizado...). Si se abre el archivo en un editor de texto, el fichero tiene un aspecto general como el del ejemplo que muestra la Figura 1.3-16: texto plano, múltiples comandos y líneas de coordenadas. Existen multitud de comandos distintos que se pueden encontrar en un archivo G-code y hay bibliotecas web que los recopilan y explican en detalle, como la de RepRap⁷² o la de Machinekit.⁷³

De forma general, los comandos que empiezan por la letra G hacen referencia a acciones de movimiento. Para el resto de las acciones de la impresora existen los comandos M, que implementan otras órdenes como establecer la temperatura de la base de impresión o hacer que la impresora espere hasta alcanzar una temperatura determinada antes de empezar a imprimir.

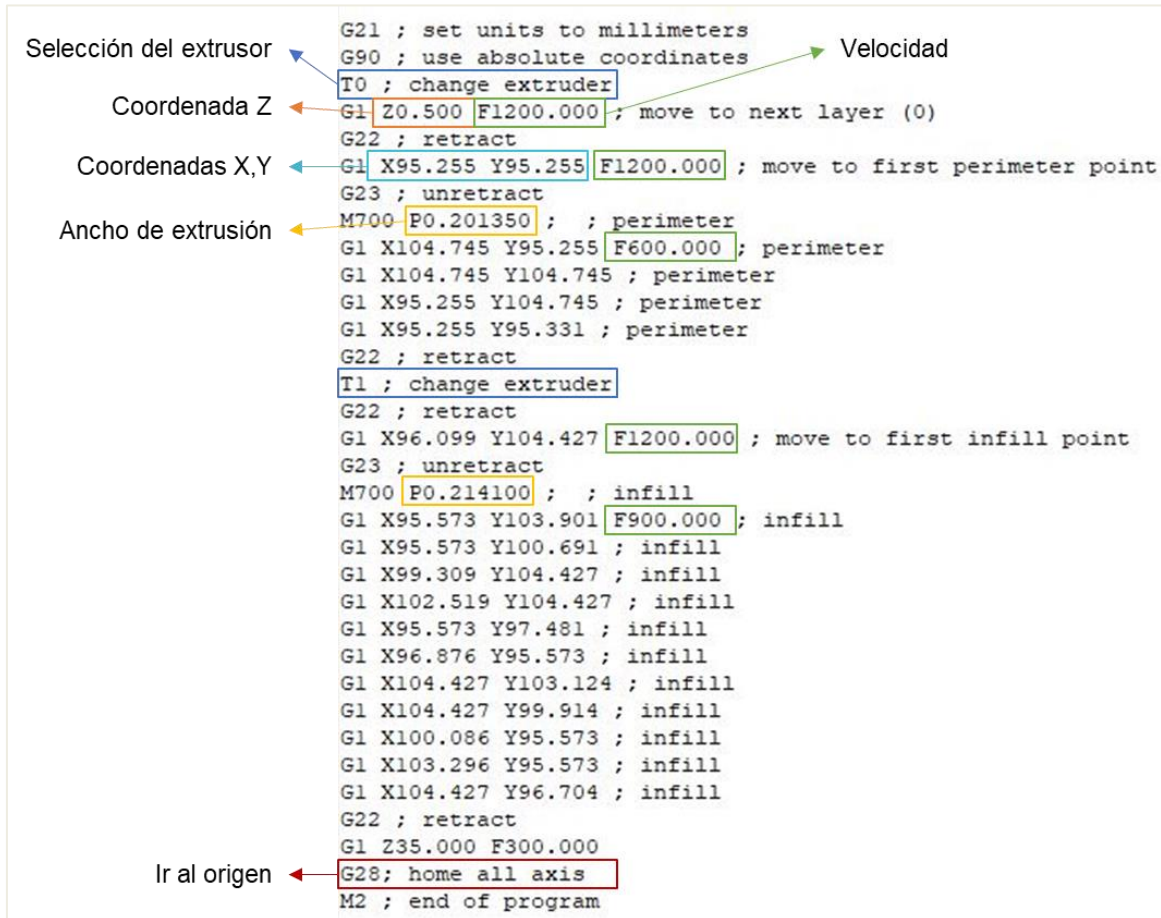


Figura 1.3-16. Ejemplo de archivo G-code.

Si analizamos el G-code del ejemplo, que describe el proceso de impresión de un cuadrado sencillo, encontramos muchos de los comandos básicos más comunes:

- *G1 “Movimiento controlado”*; indica a la impresora 3D que se mueva a un punto concreto a una velocidad específica.
- *G28 “Ir al origen”*; indica a la impresora 3D que lleve el cabezal de extrusión a la posición de origen, que para la mayoría de las impresoras es (0,0,0).
- *G90 “Movimiento absoluto”*; indica que los posteriores comandos de movimiento que reciba la impresora 3D irán referenciados sobre el origen de ésta, como se ha mencionado antes, el (0,0,0). Existe también el G91 o “movimiento relativo” el cual indica a la impresora que debe moverse con relación a las coordenadas en las que se encuentra en ese momento.
- *G21 “Establecer unidades en milímetros”*; tal y como el nombre del comando muestra, indica que los valores de movimiento a continuación de este comando

serán interpretados como milímetros. Existe también el comando G20, que establece las unidades en pulgadas.

- G22 “Retraer” y G23 “Deshacer retracción”; se utilizan para evitar que haya extrusión accidental o goteos cuando el cabezal se desplaza.
- M700 P(n) “Establecer sección de tramo”; establece el ancho de extrusión. Cuando el extrusor está habilitado y se ejecuta el movimiento, la cantidad de material extruido se calculará para que coincida con el ancho de extrusión (P) especificado.
- M2 o “Fin del programa”; indica que la etapa de impresión ha finalizado.

Conociendo estos comandos básicos y gracias a los comentarios que añade el laminador en cada línea (texto a continuación de “;”), con una lectura rápida del G-code podemos extraer y comprobar mucha información. A modo de ejemplo, del código de la Figura 1.3-16 se puede extraer lo siguiente:

- Se trata de un código diseñado para una impresora con múltiples extrusores, pues se aprecian los comandos de selección y cambio de extrusor (T(n)).
- La altura de capa está configurada en 0,5 mm, ya que la primera coordenada en Z, que determina la posición inicial del eje en la que se va a empezar a imprimir, tiene un valor de 0,500 (mm).
- La velocidad de movimiento (F) tiene un valor distinto para el viaje (20 mm/s), los perímetros (10 mm/s) y el relleno (15 mm/s). Las unidades de F son (mm/min); para encontrar el valor en (mm/s) basta simplemente con dividir F entre 60.
- Es posible diferenciar las líneas de código que generan los trazos de relleno, los del perímetro, etc., porque el texto está comentado (*verbose G-code*).
- El valor del ancho de extrusión (P) de los perímetros es ligeramente inferior al del relleno. Esto suele ser así por defecto: los perímetros son más finos para una mayor definición de la superficie externa de la figura, y el relleno más grueso para agilizar la impresión.
- Para imprimir el perímetro, se utiliza el material del extrusor 0; para el relleno de la figura, el del extrusor 1.
- Cuando la figura está terminada (después de la última línea de relleno), el cabezal se eleva 35 mm en el eje Z, a una velocidad lenta (5 mm/s) para salir de la zona de impresión sin perjudicar a la figura que ya está terminada.
- Finalmente, el cabezal se desplaza a su punto de origen (G28) y finaliza la etapa de impresión (M2).

Así pues, la simple visualización del código permite comprobar multitud de parámetros de impresión y corroborar que se corresponden con los programados experimentalmente, evitando procesos de impresión erróneos y gastos innecesarios de material.

1.3.4. Configuración y preparación de la impresora

Además de los parámetros de impresión que se establecen en los programas de laminado, existen otros puntos críticos para la calidad de las piezas que deben ser ajustados antes de iniciar la impresión. Se trata de factores relacionados directamente con el *hardware* (es decir, con la impresora), como la calibración de la altura de la boquilla o la selección del soporte de impresión adecuado. En este apartado del proceso de impresión se incluyen también el ajuste de los cartuchos de tinta en los cabezales y la configuración de las temperaturas de los extrusores y de la base de impresión, si la tinta lo requiere.

1.3.4.1. Carga de cartuchos y configuración de temperaturas

En el caso de trabajar con tintas termorreversibles, es importante asegurar una correcta transición entre temperaturas jeringuilla-soporte de impresión y un correcto mantenimiento de estas durante todo el proceso de impresión. Por eso, el primer paso es establecer la temperatura deseada en ambas partes de la impresora, ya sea mediante la interfaz gráfica de usuario (GUI) del software de control (en el caso de los extrusores) o bien mediante los controles del propio chiller externo (en el caso de la base). Para tintas que necesiten extrusión en caliente, es altamente recomendable atemperar las jeringuillas en un baño antes de utilizarlas para que el tiempo de espera previo al uso sea menor.

Para colocar la jeringuilla en el extrusor, se ha de roscar primeramente la punta o boquilla a utilizar y luego bascular el cuerpo del extrusor para poder introducir el depósito de tinta sin dificultad (Figura 1.3-17A). Después, se devuelve el extrusor a su posición original y se hace descender la varilla roscada a través de la GUI hasta que empiece a presionar el émbolo de la jeringa. Es necesario haber cargado correctamente el cartucho (todo el cuerpo de la jeringa debe estar dentro del cuerpo del extrusor) y haber ajustado la varilla roscada al émbolo para, de este modo, evitar cualquier variación posterior en la altura de la jeringuilla que pueda comprometer la calibración que se realice (Figura 1.3-17B).

Finalmente, se debe colocar la tapa protectora para evitar contactos accidentales con la superficie caliente del extrusor, eliminando además cualquier posible riesgo de

atrapamiento de extremidades (dedos) con las varillas roscadas que ejercen de empujadores (Figura 1.3-17C). Una vez concluida esta etapa, se puede iniciar el proceso de calibración de la altura de las boquillas previo al proceso de impresión.

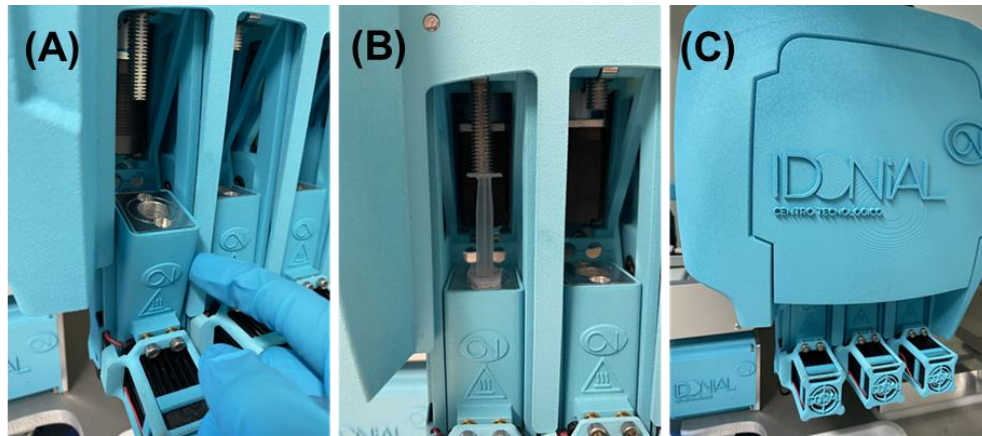


Figura 1.3-17. Proceso de carga de las jeringas en la impresora.

1.3.4.2. Calibración y altura de la boquilla

La distancia entre la punta de la boquilla del extrusor y la base o plataforma de impresión, llamada altura de la boquilla (h_c), influye enormemente en la geometría de la sección transversal del filamento de material extruido y en el grosor de trazo obtenido, lo cual también afecta a la definición de la figura y a la corrección en los trazos.

Si la altura es muy pequeña, el volumen de material es demasiado grande para el espacio que queda entre la plataforma y el orificio de la boquilla, y como resultado, la tinta se ve obligada a extenderse hacia los lados, generando multitud de defectos e irregularidades en la figura final. Por otro lado, cuando la altura es mayor, también lo es el espacio dentro del cual puede fluir la tinta, siendo las propiedades reológicas y la humectabilidad del material las que dictan la sección transversal del filamento.⁷⁴ Paralelamente se ha observado que, con el aumento de la altura de la boquilla, los trazos son curvos en los cambios de dirección de la impresora mientras que, cuando se disminuye esa altura y se ajusta a un valor óptimo, estos presentan un ángulo recto bien definido (Figura 1.3-18). Este efecto se produce porque, cuando hay demasiada altura, la tinta sufre un retraso en la deposición con respecto al cambio de sentido del cabezal en la impresión.^{56,66,75}

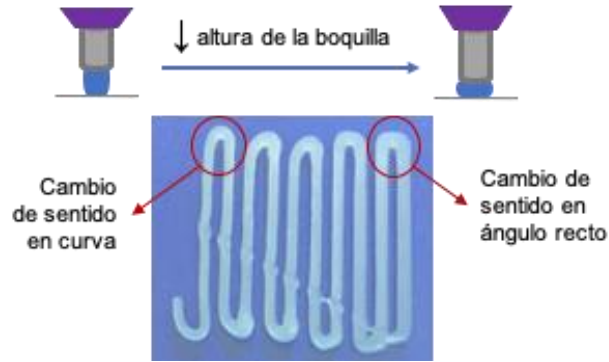


Figura 1.3-18. Influencia de la altura de la boquilla en el trazo resultante.

De ese modo, muchos estudios sugieren que la altura entre la boquilla y la cama de impresión también es crítica para el sistema de impresión 3D y se debe determinar la adecuada para lograr la geometría del objetivo con fidelidad.^{50,67,75-77} Wang y Shaw establecieron una ecuación para la determinación de h_c :

$$h_c = \frac{V_d}{v_n D_n} \quad \text{Ecuación (1)}$$

donde V_d es el volumen de material extruido por unidad de tiempo (cm^3/s), v_n la velocidad de movimiento de la boquilla (mm/s) y D_n el diámetro de la boquilla (mm).⁷⁴

Esta fórmula ha sido aplicada en diversos trabajos que indicaron, de forma general, que la aplicación de una altura de boquilla inferior al valor calculado de h_c daba lugar a líneas extruidas más gruesas de lo previsto y que, en el caso contrario, la aplicación de una altura de boquilla superior a h_c provocaba que parte de las líneas extruidas no alcanzaran la superficie de construcción antes de que el cabezal cambiara el sentido o la dirección de la impresión y, por lo tanto, se produjeran secciones inexactas.^{50,67,78} Sin embargo, esta ecuación no resultó ser adecuada para fluidos más débiles, pues sufren una mayor difusión sobre la superficie de impresión. En estos casos, la metodología más adecuada para optimizar h_c es la experimental: imprimir líneas rectas o rellenos rectilíneos simples desde diferentes alturas para medir el grosor del filamento o el ángulo obtenido.^{66,79} Cuanto más homogénea es la anchura del filamento depositado y más rectos los ángulos, más adecuada es la altura seleccionada.

1.3.4.3. Soportes de impresión y metodología FRESH

La selección del soporte de impresión depende, en gran parte, de la finalidad del producto impreso y de la conservación que requiera. Por ejemplo, los trabajos con células vivas suelen necesitar soportes estériles y que permitan la introducción y conservación del medio líquido de cultivo. Aun así, las placas de vidrio planas acostumbran a ser el soporte más escogido, pues son reutilizables y fáciles de limpiar, económicas, y permiten que se retire la pieza finalizada de la base de impresión de forma rápida. Sin embargo, el uso de soportes físicos planos (ya sean placas Petri o vidrios sencillos) no permite la impresión de geles muy débiles que colapsan al depositarse ni tampoco la creación de microestructuras cercanas a los tejidos reales.⁸⁰ Para intentar superar estas limitaciones, Hinton et al., idearon el método FRESH (acrónimo de *Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels*), que utiliza un baño de micropartículas de gelatina como soporte (Figura 1.3-19).

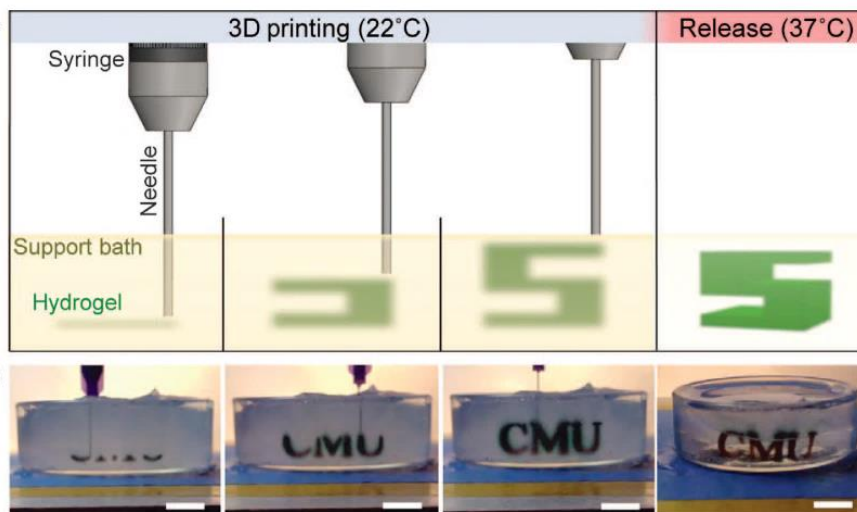


Figura 1.3-19. Ejemplo de impresión en soporte FRESH. Extraído de (Hinton et al., 2015).

La innovación clave en FRESH es la deposición e incrustación de la tinta de forma temporal en este material biocompatible y termorreversible, que mejora significativamente la fidelidad y mantiene la estructura deseada durante el proceso de impresión, y que se puede calentar y retirar fácilmente al finalizar la impresión. El empleo de la metodología FRESH ha sido adoptado por investigadores que trabajan en tejidos blandos, pues permite imprimir biomateriales como el colágeno y el alginato en geometrías complejas que de otro modo serían imposibles de fabricar.⁸⁰⁻⁸²

1.3.5. Postprocesado y retirada de las piezas finales

En general, el post procesamiento en la impresión 3D se refiere a cualquier proceso o tarea que deba realizarse en una pieza impresa, o cualquier técnica utilizada para extraer, tratar y perfeccionar las piezas que salen de una impresora 3D.

Para algunas tecnologías de impresión 3D, la retirada de las piezas es tan simple como separar la figura impresa de la plataforma de construcción. Para otros métodos de impresión 3D más industriales, la extracción es un proceso altamente técnico que implica una escisión precisa de la pieza mientras todavía está encerrada en el material de construcción o adherida a una placa de soporte. Estos métodos generalmente también requieren procedimientos de extracción estrictos y operadores altamente capacitados, además de equipos de protección individual y entornos controlados debido a los residuos que se producen (polvos, sustancias volátiles...)(Figura 1.3-20).^{83,84}



Figura 1.3-20. Operario realizando trabajos de postprocesado. Extraído de (Vázquez, 2019).

En el caso de la extrusión de semisólidos, los procedimientos de postprocesado varían principalmente en función de la composición de la tinta. Algunas permiten manipular de inmediato las piezas terminadas, mientras que otras requieren procesos de gelificación o solidificación de distinta índole: curado con luz visible o ultravioleta, variaciones térmicas, reacciones de reticulación iónica, reacciones enzimáticas... Para las tintas que requieren un soporte, como la tecnología FRESH mencionada anteriormente, la etapa de eliminación de la gelatina mediante fusión también podría considerarse un paso de postprocesamiento.

Por otro lado, cuando se trata de tintas biomateriales con contenido celular (biotintas), normalmente se realizan postprocesados tanto para favorecer la estabilidad de forma del constructo impreso, como para mantener y mejorar la viabilidad de las células. Este proceso es más comúnmente conocido como post-bioprinting.⁸⁵⁻⁸⁷ En muchos casos, si se trata de figuras destinadas al cultivo *in vitro*, ni siquiera es recomendable retirar las figuras de las propias placas de impresión, pues su manipulación supone un mayor riesgo de contaminación o de destrucción de los impresos.

Así pues, se puede concluir que, tanto las distintas etapas, como los ensayos y validaciones del proceso de impresión 3D, pueden sufrir variaciones en función de los materiales empleados o del producto final ideado y su uso. Por ello, cada una de las fórmulas preparadas y estudiadas en la presente Tesis (con finalidades muy distintas entre ellas), y sus procesos de impresión y validación, serán detalladas por separado en capítulos individuales a lo largo del presente documento.

1.4. Reología e impresión 3D

La reología (del griego *réos*, corriente de agua; y *-logía*, ciencia o estudio) se define como el estudio de los principios físicos que regulan el flujo y la deformación de la materia sometida a fuerzas.

El uso práctico de la reología se encuentra dentro de áreas como el control de calidad y producción, la ingeniería química y mecánica, la investigación y el desarrollo industrial o la ciencia de materiales en numerosas industrias (farmacéutica, cosmética, agroalimentaria, cerámica, de pinturas...) donde plásticos, fibras sintéticas, pastas, lubricantes, cremas, suspensiones o emulsiones constituyen la materia prima y son objeto de estudio.⁸⁸ Por ello, actualmente se acepta que la reología es una ciencia interdisciplinar cuyo desarrollo realizan no únicamente físicos, sino también ingenieros de diversas especialidades, matemáticos, químicos, biólogos, farmacéuticos, etc., dando lugar a un amplio abanico de posibilidades prácticas de aplicación.

De forma previsible, el estudio de la reología es de gran importancia dentro de la impresión 3D, pues durante todo el proceso de impresión la tinta se ve sometida a una combinación de fuerzas externas y etapas de recuperación o reposo que afectan a su comportamiento y a sus características.

Para poder comprender los distintos tipos de fluidos existentes, sus propiedades y los ensayos necesarios para su caracterización, se requiere una familiarización con los fundamentos teóricos de la reología. El propósito de esta sección es proporcionar una base teórica sobre terminología y conceptos reológicos, y su aplicabilidad a la impresión 3D a través de la evaluación de la imprimibilidad de las tintas a utilizar.

1.4.1. Fundamentos de reología

Los fluidos pueden catalogarse según su respuesta a la presión aplicada de forma externa o según los efectos que produce sobre ellos la acción de un esfuerzo cortante o de cizalladura. El primer sistema de clasificación conduce a los llamados fluidos compresibles

e incompresibles, en función de si el volumen del fluido depende o no de su presión.⁸⁹ Sin embargo, el esquema de clasificación más común es el basado en la respuesta del fluido a un esfuerzo de corte impuesto externamente, es decir, la clasificación reológica (Figura 1.4-1).

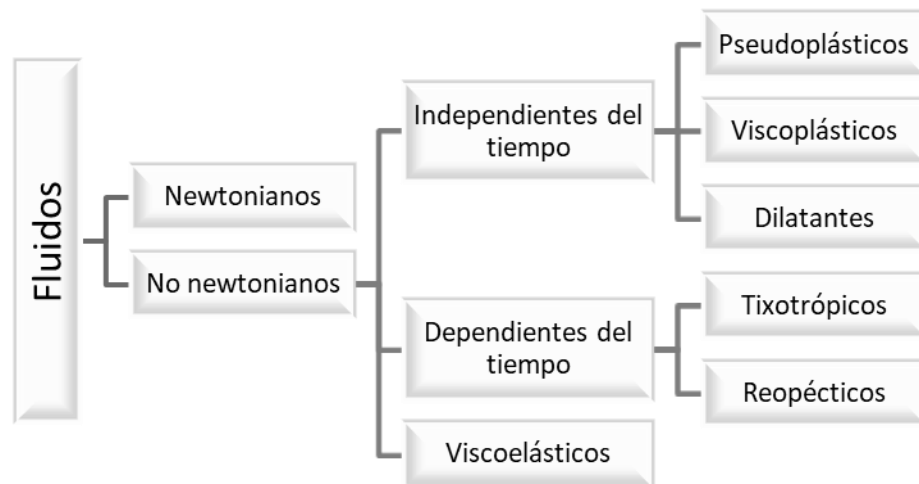


Figura 1.4-1. Clasificación reológica de los fluidos.

Para poder comprender esta clasificación, es fundamental hacer referencia a la Ley de Newton:

$$\frac{F}{A} = \tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde, (τ): esfuerzo cortante (*shear stress*) [Pa], (μ): viscosidad [Pa·s], y ($\dot{\gamma}$): velocidad de corte, de cizallamiento o de cizalla (*shear rate*) [s^{-1}]. Para un fluido newtoniano incompresible en flujo laminar, el esfuerzo de corte resultante es igual al producto de la velocidad de corte por la viscosidad del medio fluido.

Así pues, la viscosidad (μ) es una constante de proporcionalidad característica del material, de su temperatura y presión, que no depende de $\dot{\gamma}$ ni de τ .^{90,91} La viscosidad refleja la resistencia al flujo que ofrece el líquido y su valor disminuye a medida que aumenta la temperatura y decrece la presión.⁹²

La representación gráfica del esfuerzo cortante (τ) respecto a la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$), que lleva el nombre de reograma o curva de flujo, para un fluido newtoniano es una línea recta de pendiente μ (o viscosidad newtoniana) y que pasa por el origen.

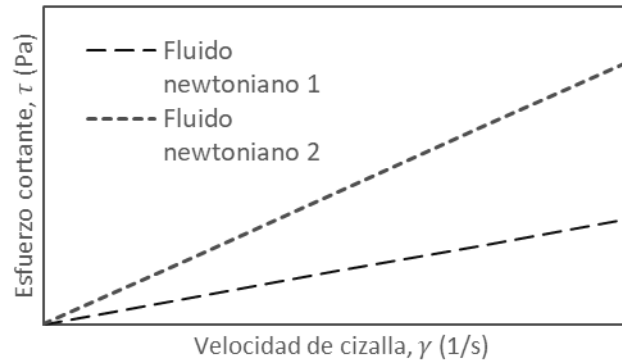


Figura 1.4-2. Ejemplo de reograma de dos fluidos newtonianos distintos.

Por el contrario, un fluido no newtoniano es aquel en el que la curva de flujo no es lineal o no pasa a través del origen, es decir, para el que la viscosidad no es constante a una temperatura y presión determinadas, y depende de las condiciones de flujo (como la geometría del flujo o la velocidad de corte), o incluso de la historia cinemática del elemento fluido en consideración.^{90,93,94} Para el caso de los no newtonianos, se puede definir una viscosidad aparente (η) a partir de una ecuación análoga a la ley de Newton de la viscosidad.

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Debido a la similitud entre las ecuaciones (Ecuación 2) y (Ecuación 3), es muy común encontrar viscosidades aparentes representadas con (μ), de modo que en esta Tesis se empleará esta simplificación y se hará referencia a cualquier viscosidad con el símbolo (μ).

Los fluidos no newtonianos, a su vez, pueden agruparse convenientemente en tres clases generales:

- **Fluidos independientes del tiempo**, para los cuales el esfuerzo cortante en cualquier punto está determinado únicamente por el valor de la velocidad de corte en ese punto.
- **Fluidos dependientes del tiempo**, fluidos más complejos, para los cuales la relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de corte depende, además, de la duración del esfuerzo de corte y de la historia cinemática del fluido.
- **Fluidos viscoelásticos**, que después de la deformación muestran una recuperación elástica parcial.

Cabe destacar que este esquema de clasificación es ligeramente arbitrario ya que la mayoría de los materiales reales a menudo exhiben una combinación de dos, o incluso tres, comportamientos no newtonianos distintos. Sin embargo, generalmente, es posible identificar la característica no newtoniana dominante y tomar ésta como base para los cálculos y discusiones posteriores.

1.4.1.1. Fluidos independientes del tiempo

El comportamiento de este tipo de materiales se describe de forma general mediante la fórmula:

$$\dot{\gamma} = f(\tau) \quad (\text{Ecuación 4})$$

que implica que el valor de (τ) en cualquier punto dentro del fluido cizallado está determinado solamente por el valor de la velocidad de corte en ese punto, o viceversa. Dependiendo de la forma de la función f , estos fluidos pueden subdividirse en tres tipos: pseudoplásticos, viscoplásticos o dilatantes.

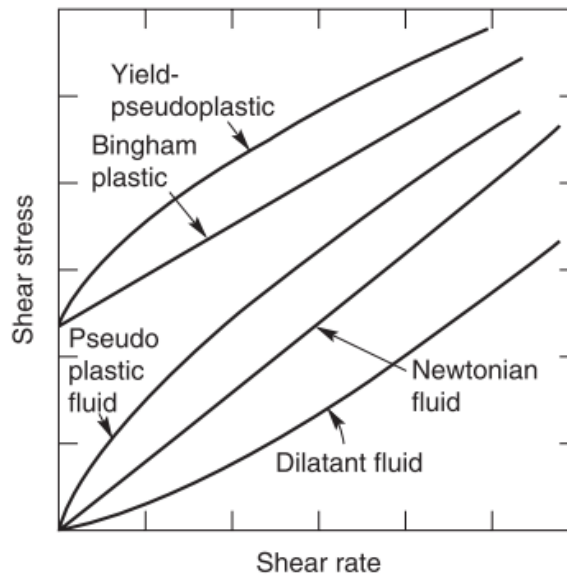


Figura 1.4-3. Tipos de fluidos independientes del tiempo. Extraído de (Chhabra and Richardson, 2008).

En la literatura se han propuesto muchas expresiones matemáticas, de diferente complejidad y forma, que proporcionan relaciones empíricas entre esfuerzo cortante y velocidad de corte o viscosidad aparente, desde intentos directos de ajuste de curvas, hasta otros basados en mecánica estadística.⁹⁵ Estos modelos teóricos se pueden

implementar como una herramienta *in silico* para obtener cierta información sobre las capacidades de un material. Sin embargo, en la práctica se requiere de validaciones experimentales, pues los modelos tienden a las simplificaciones y aproximaciones.⁹⁶

Fluidos pseudoplásticos

Son los fluidos no newtonianos e independientes del tiempo más comunes. En los materiales pseudoplásticos la viscosidad aparente disminuye a medida que aumenta la velocidad de cizallamiento. Para los fluidos pseudoplásticos, el modelo matemático más utilizado es la Ley de Potencia o modelo Ostwald de Waele, seguido del modelo Sisko.

Modelo Ostwald de Waele o Ley de Potencia

Este modelo se basa en que la relación entre el esfuerzo de corte y la velocidad de cizallamiento (representada en coordenadas logarítmicas dobles) se puede aproximar mediante una línea recta en un rango limitado de valores (Figura 1.4-4).⁹⁷

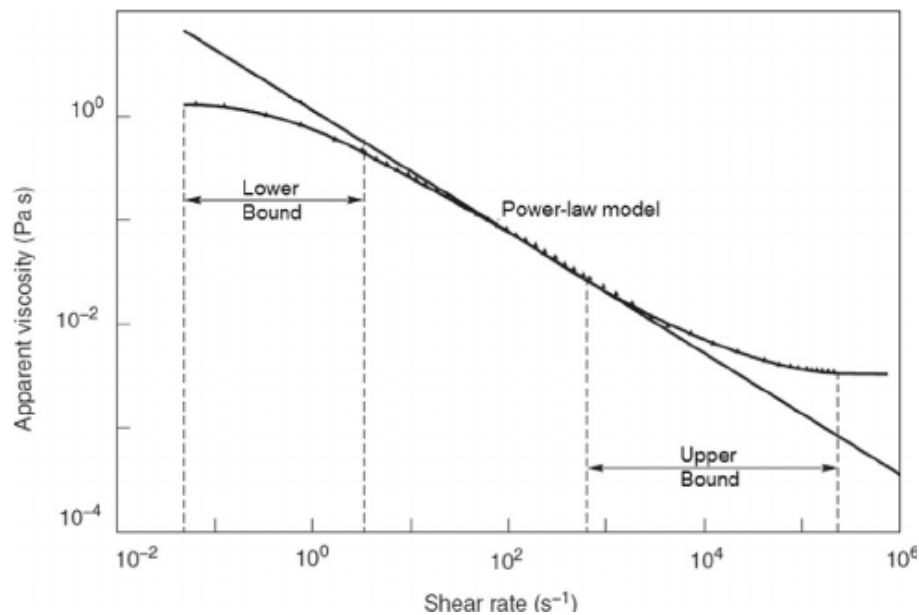


Figura 1.4-4. Ejemplo de aplicación de la Ley de Potencia. Extraído de (Lakkanna et al., 2016).

Y para esta parte de la curva de flujo, se aplica la expresión:

$$\tau = K(\dot{\gamma})^n \quad (\text{Ecuación 5})$$

Siendo la viscosidad aparente:

$$\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = K(\dot{\gamma})^{n-1} \quad (\text{Ecuación 6})$$

En estas ecuaciones, K y n son dos parámetros empíricos llamados, respectivamente, índice de consistencia [$\text{Pa}\cdot\text{s}^n$] e índice de flujo, que carece de unidades.^{90,92,93}

Si el valor de $n < 1$, el fluido exhibe propiedades pseudoplásticas; si $n = 1$, el fluido es newtoniano y si $n > 1$, el fluido es dilatante. Cuanto menor es el valor de n , mayor carácter pseudoplástico (*shear-thinning behaviour*, en inglés) posee el fluido.

Es uno de los modelos más comúnmente utilizados porque, en la práctica, un solo aparato no puede medir todo el espectro por falta de sensibilidad (a valores muy bajos de $\dot{\gamma}$) o de robustez (a valores altos de $\dot{\gamma}$). De ese modo, el margen de velocidad de corte en el que se suele trabajar es de 0,1 a 10^4 s^{-1} , que corresponde con la parte recta del reograma a la que se puede aplicar dicha Ley.

Modelo Sisko

El modelo Sisko extiende el modelo Ley de Potencia para incluir un valor de viscosidad cuando las velocidades de deformación se acercan al infinito. De ese modo, puede ser aplicado en operaciones como el bombeo de alimentos líquidos y procesos de mezcla que implican altos gradientes de velocidad.⁹⁸⁻¹⁰² También es el más capaz de predecir la reología sanguínea a altas tasas de velocidad de corte.¹⁰³

La expresión matemática de tres parámetros desarrollada por Sisko es la siguiente:

$$\tau = \mu_{\infty} \cdot \dot{\gamma} + K(\dot{\gamma})^n \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde el nuevo parámetro μ_{∞} , representa la viscosidad a velocidad de cizallamiento infinita. De ese modo, la viscosidad aparente se obtiene mediante la expresión:

$$\mu = \mu_{\infty} + K(\dot{\gamma})^{n-1} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Del mismo modo que la Ley de Potencia, los valores de μ_{∞} , K y n se especifican para cada fluido por separado y se obtienen a partir de mediciones experimentales.

Fluidos viscoplásticos

Los fluidos viscoplásticos son aquellos en los que existe un umbral de fluencia (τ_0) que debe ser excedido para que el fluido se deforme o fluya.

El material, en reposo, tiene una estructura tridimensional de suficiente rigidez como para resistir una tensión externa menor que τ_0 y se deforma elásticamente.^{90,104,105} Por el contrario, para fuerzas mayores a τ_0 , la estructura se rompe y pasan a comportarse como fluidos. Si el esfuerzo cortante tiene una dependencia lineal con la velocidad de cizallamiento, se trata de fluidos tipo plástico de Bingham, en cambio, si no existe dicha dependencia se trata de un pseudoplástico de Bingham (Figura 1.4-3).

En la mayoría de los casos, este paso de sustancia firme a fluido viscoso es reversible. La recuperación de la estructura se produce en mayor o menor porcentaje dependiendo de cada material. Algunos ejemplos de fluidos con este comportamiento son la pasta de dientes, la mermelada o la clara de huevo. Existen distintos modelos matemáticos usados para describir fluidos viscoplásticos, siendo los más comunes el modelo Bingham, el modelo Herschel-Bulkley y el modelo Casson (Figura 1.4-5).¹⁰⁶

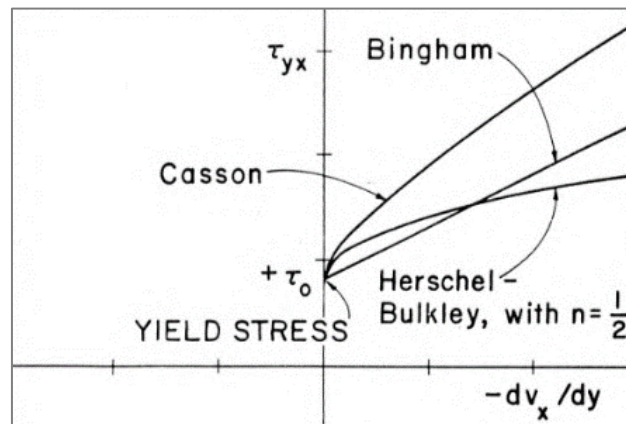


Figura 1.4-5. Formas generales de las expresiones empíricas para los viscoplásticos. Extraído de (Bird et al., 1983).

Modelo Bingham

Es la ecuación más simple para describir un fluido con umbral de fluencia, representando una relación lineal entre el esfuerzo cortante y la velocidad de cizallamiento, compensado con el valor de τ_0 .^{90,94,106,107}

Los parámetros que caracterizan este modelo son el umbral de fluencia (τ_0), y la viscosidad plástica (μ_B):

$$\begin{aligned} \tau &= \tau_0 + \mu_B(\dot{\gamma}) & \text{para } |\tau| > |\tau_0| \\ \dot{\gamma} &= 0 & \text{para } |\tau| < |\tau_0| \end{aligned} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Esta expresión matemática de dos parámetros (μ_B y τ_0) es sencilla de aplicar. Sin embargo, la mayoría de los fluidos complejos no tienen una relación lineal entre τ y $\dot{\gamma}$, por lo que se generan valores extremadamente altos de τ_0 y el modelo no resulta conveniente.¹⁰⁰

Modelo Herschel-Bulkley

El modelo Herschel-Bulkley es una adaptación del modelo de Bingham para fluidos con reogramas no lineales. Este modelo ha sido ampliamente utilizado para caracterizar alimentos, como el chocolate fundido, el yogur o distintos purés.¹⁰⁷⁻¹¹⁰

$$\begin{aligned} \tau &= \tau_0 + K(\dot{\gamma})^n && \text{para } |\tau| > |\tau_0| \\ \dot{\gamma} &= 0 && \text{para } |\tau| < |\tau_0| \end{aligned} \quad \text{(Ecuación 10)}$$

Los parámetros que caracterizan este modelo son el umbral de fluencia (τ_0), el índice de flujo (n) y el índice de consistencia (K). En este modelo, las dimensiones de K dependen también del valor de n . Con el uso de un tercer parámetro, se proporciona un ajuste mejor a algunos datos experimentales.^{106,107,111}

Modelo Casson

Es otro modelo de dos parámetros utilizado para describir variedad de alimentos y materiales biológicos.^{90,112}

$$\begin{aligned} (\tau)^{1/2} &= (\tau_0)^{1/2} + (\mu_c \dot{\gamma})^{1/2} && \text{para } |\tau| > |\tau_0| \\ \dot{\gamma} &= 0 && \text{para } |\tau| < |\tau_0| \end{aligned} \quad \text{(Ecuación 11)}$$

En comparación con el modelo Bingham, el modelo Casson puede predecir el comportamiento reológico de un fluido a baja velocidad de corte con más precisión.¹⁰⁰

Fluidos dilatantes

Los fluidos dilatantes poseen en común con los fluidos pseudoplásticos el hecho de no tener umbral de fluencia (τ_0) pero, de forma contraria a éstos, la viscosidad aparente (μ) aumenta a medida que lo hace la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$).

Este comportamiento puede explicarse de forma sencilla: en reposo, el líquido presente en el fluido llena todo el espacio entre las partículas y, a bajos niveles de cizallamiento, lubrica el movimiento de cada partícula sobre las otras. Sin embargo, al aplicar altas velocidades de deformación, se produce un empaquetamiento de las partículas que no permite el paso

del líquido entre ellas, maximizándose la fricción sólido-sólido y generando esa mayor resistencia (Figura 1.4-6).^{90,92} Son ejemplos de este tipo de fluidos la harina de maíz mezclada con agua o la arena fina de playa cuando está mojada.

Del mismo modo que los pseudoplásticos, los fluidos dilatantes se suelen ajustar a la Ley de Potencia o al modelo Sisko, mencionadas anteriormente.

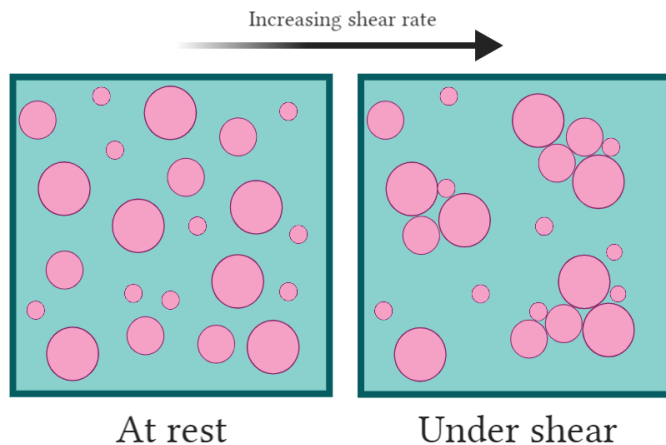


Figura 1.4-6. Esquema representativo del comportamiento de un fluido dilatante.

1.4.1.2. Fluidos dependientes del tiempo

Los fluidos dependientes del tiempo son aquellos para los cuales esfuerzo cortante (τ) es función de la magnitud y la duración de la cizalla, y del lapso entre aplicaciones consecutivas. Este fenómeno es también reversible pues, al cesar el esfuerzo de corte, la viscosidad aparente se recupera.

Se reconocen dos tipos principales de fluidos dependientes del tiempo: los fluidos tixotrópicos y los fluidos antitixotrópicos o reopéticos, dependiendo de si el esfuerzo cortante, al aplicar una velocidad de corte determinada y a temperatura constante, disminuye o aumenta con el tiempo (Figura 1.4-7).

Aunque la teoría sobre los fluidos dependientes del tiempo no está bien desarrollada, existe un consenso general que apunta como origen de este comportamiento a un cambio reversible en la estructura del fluido producido durante el proceso de flujo.¹¹³ Contrariamente al caso de los fluidos newtonianos o los fluidos independientes del tiempo, no es posible utilizar ecuaciones matemáticas simples para describir el comportamiento de los fluidos tixotrópicos o reopéticos; es necesario realizar mediciones en el rango de condiciones de interés.^{90,114}

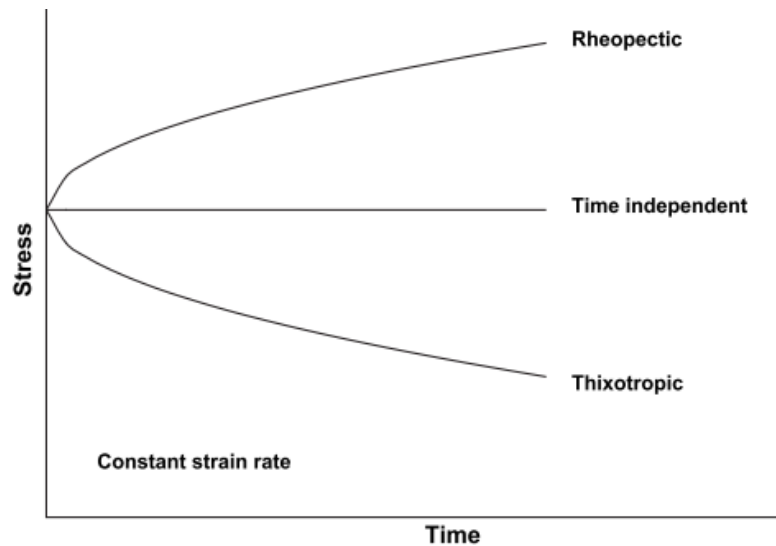


Figura 1.4-7. Comportamiento de los fluidos dependientes del tiempo a una velocidad de corte y temperatura constantes. Extraído de (Sochi, 2010).

Fluidos tixotrópicos

Un material tixotrópico se vuelve más fluido cuanto más se prolonga en el tiempo un esfuerzo cortante constante sobre él. Para los fluidos dependientes del tiempo, si se realiza una curva de flujo aumentando la velocidad de cizallamiento desde cero a algún valor máximo y luego se disminuye a cero a la misma velocidad, se obtiene un ciclo de histéresis (Figura 1.4-8) mientras que, en los fluidos independientes del tiempo, este bucle no se observa.

La viscosidad de los materiales tixotrópicos no sigue el mismo camino en la descomposición y recuperación de la estructura. Durante la aceleración de la velocidad de corte, la ruptura de la estructura va a la zaga de la velocidad de corte, lo que lleva a viscosidades transitorias mayores que las esperadas en estado estacionario. En la rama descendente, la estructura se reconstruye continuamente a medida que disminuye la velocidad de corte, pero las viscosidades son más bajas que las obtenidas en estado estacionario.^{115,116}

Gráficamente, el área superficial del bucle se ha propuesto como una medida cuantitativa de la tixotropía, pero el método tiene algunas limitaciones serias pues la altura, la forma y el área cerrada del bucle de histéresis dependen de la duración de la cizalla, la tasa de aumento o disminución de la cizalla y el historial cinemático pasado de la muestra.

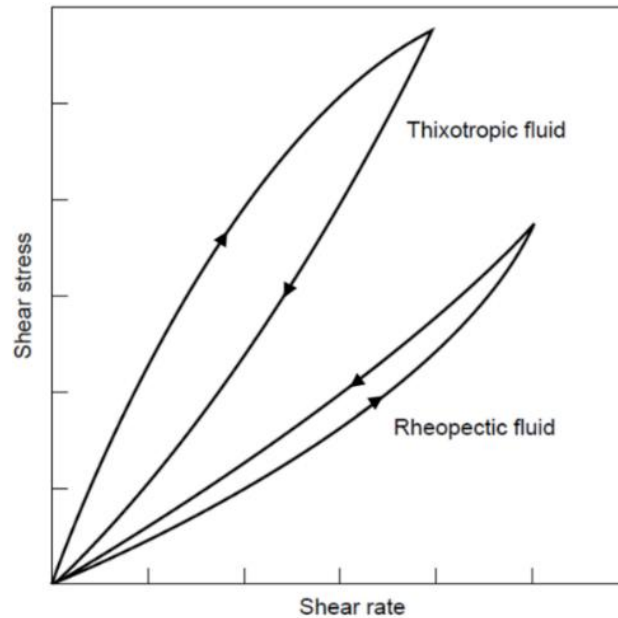


Figura 1.4-8. Reograma que ejemplifica el bucle de histéresis para los fluidos tixotrópicos y los fluidos reopécticos. Extraído de (Sochi, 2010).

No debe confundirse la tixotropía con la pseudoplasticidad o la dilatancia, fenómenos independientes del tiempo mencionados anteriormente, en los que la viscosidad depende directamente de la magnitud de la velocidad de corte; aunque es común que un fluido tixotrópico presente, a su vez, alguno de estos dos fenómenos.^{114,117}

Fluidos reopécticos

Los fluidos muestran reopexia o tixotropía negativa cuando la viscosidad aparente aumenta con el tiempo de cizallamiento. Nuevamente, se observan efectos de histéresis en la curva de flujo, pero en este caso a la inversa en comparación con un material tixotrópico (Figura 1.4-8) ya que en un fluido reopéctico, el cizallamiento promueve la formación interna de estructura, y esta se descompone cuando el material está en reposo.

1.4.1.3. Fluidos viscoelásticos

Los fluidos viscoelásticos tienen características intermedias entre los sólidos elásticos y los fluidos puramente viscosos. Dentro de este grupo se encuentran las soluciones poliméricas, emulsiones o suspensiones de partículas, determinados alimentos, productos farmacéuticos, materiales de recubrimientos, fluidos y tejidos biológicos, etc.

La viscoelasticidad se puede medir mediante pruebas estáticas y pruebas dinámicas. Las pruebas estáticas incluyen ensayos de fractura o deformación, que están fuera del alcance de esta Tesis. En este trabajo se discutirán medidas dinámicas, en concreto, los ensayos viscoelásticos dinámicos de baja amplitud —en inglés, *Small Amplitude Oscillatory Shear (SAOS) tests*—, que se obtienen por reometría oscilatoria. Para las pruebas oscilatorias, la muestra se somete a un esfuerzo oscilatorio sinusoidal para medir la respuesta elástica y viscosa del material (Figura 1.4-9).

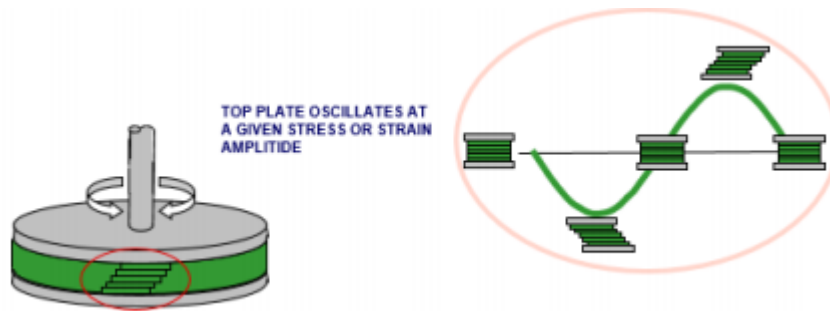


Figura 1.4-9. Esquema de funcionamiento de la reometría oscilatoria. Extraído de (Malvern Instruments, 2016).

Los ensayos SAOS se han convertido en el método canónico para probar las propiedades viscoelásticas lineales de fluidos complejos o materiales blandos debido a la sólida base teórica y los protocolos de ensayo sencillos de aplicar.^{118–120}

La respuesta viscoelástica de un fluido se cuantifica mediante dos funciones principales: el módulo elástico o de almacenamiento (G'), relacionado con la energía que acumula el material por cada ciclo de oscilación, y el módulo viscoso o de pérdidas (G''), asociado con la energía que se disipa durante el proceso de cambiar la estructura del material, es decir, cuando la muestra fluye parcial o totalmente.^{88,96,121}

La relación G''/G' se conoce como tangente de pérdidas o $\tan(\delta)$ e indica, de forma simplificada, si el material, en ese momento, se está comportando más como un sólido, o como un líquido. Desde un punto de vista práctico, el valor de $\tan(\delta)$ es un criterio de análisis importante para los procesos de formación, endurecimiento y curado de un gel. De ese modo, para el estado fluido o líquido ("estado sol"), el valor de $\tan(\delta)$ es mayor que 1 (pues $G'' > G'$) mientras que, para el estado similar al gel o el estado sólido, el valor de $\tan(\delta)$ es inferior a 1 (pues $G' > G''$). En el punto en el que la transición sol-gel se mantiene, $\tan(\delta)$ tiene un valor igual a 1.^{88,122}

A modo de apunte, y por similitud de conceptos, es importante no confundir un material viscoplástico con uno viscoelástico. Desde una perspectiva reológica, la principal

diferencia entre ambos es la presencia de un umbral de fluencia (τ_0). El fluido viscoplástico tiene esa tensión umbral bajo la cual no sufre deformación, mientras que el fluido viscoelástico se deforma con cualquier estrés aplicado.

1.4.2. Evaluación de la imprimibilidad

A través del estudio de la reología de un fluido se puede evaluar su imprimibilidad, es decir, su capacidad o aptitud para ser empleada como tinta para impresión 3D mediante extrusión de semisólidos. La resolución, la fidelidad de forma y la reproducibilidad del proceso de impresión dependen en gran medida del comportamiento del fluido y, por ello, diversos estudios han identificado parámetros que potencialmente ayudan a controlar y medir la imprimibilidad de variedad de materiales, destacando las propiedades reológicas más adecuadas para este tipo de procesos.^{57,66,96,123-127}

En el caso de la extrusión de semisólidos, existen al menos tres puntos críticos donde las propiedades reológicas de la tinta tienen un papel crucial y determinan su imprimibilidad (Figura 1.4-10).

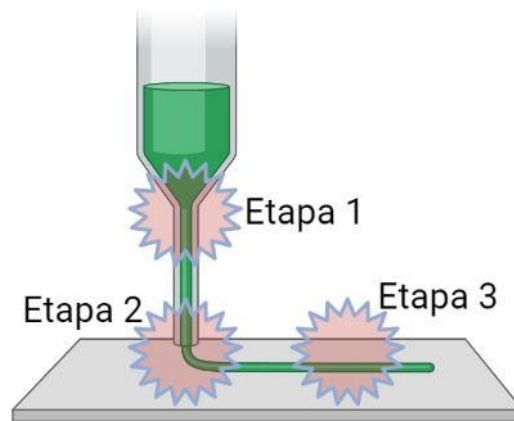


Figura 1.4-10. Puntos críticos de la extrusión afectados por la reología de la tinta.

El primero de los puntos se sitúa en la boquilla, en el momento previo a la extrusión: al aplicar una fuerza sobre el fluido en reposo, su viscosidad debe disminuir de forma rápida para poder extruirse fácilmente a través de un orificio de pequeño diámetro. Sin embargo, cuando la fuerza externa cesa, la viscosidad ha de recuperarse suficientemente como para que no se produzcan deposiciones no deseadas de material cuando el cabezal se desplaza. Por lo tanto, es altamente conveniente que las tintas tengan un carácter

pseudoplástico y un esfuerzo cortante umbral (τ_0) que deba sobrepasarse para que la tinta empiece a fluir. Si un fluido es muy pseudoplástico, necesitará un esfuerzo menor para fluir y su deposición podrá controlarse más fácilmente a través de la velocidad de extrusión (ya sea mecánica o neumática) y de otros parámetros como el diámetro de la boquilla (a menor diámetro, mayor velocidad de cizalla sobre el fluido). La presencia de un umbral de fluencia en las tintas que van a ser impresas reduce la posibilidad de que se produzcan goteos o deposiciones accidentales en la figura. Algunos autores lo relacionan, además, con la capacidad autoportante del fluido y la formación de filamentos continuos con mínima deformación.^{125,127-130}

En un segundo punto, la tinta debe tener una cierta resistencia mecánica una vez sale de la boquilla para minimizar su deformación, recuperar un grado de viscosidad mayor, y generar así un flujo uniforme. En este punto, la viscoelasticidad del fluido determinará si una vez fuera de la boquilla prevalece el comportamiento elástico ($G' \gg G''$), o si, por el contrario, la prevalencia es viscosa ($G'' \gg G'$), afectando en gran medida a la forma del filamento generado y, en consecuencia, a la fidelidad de forma del impreso final.

El tiempo de recuperación de la viscosidad y de la estructura interna del gel después del esfuerzo también afecta a la tercera de las etapas críticas: la deposición sobre la superficie de impresión. Este último punto del proceso de extrusión exige que la tinta adquiera, en un lapso de tiempo corto, una capacidad autoportante suficiente como para poder soportar el peso de las capas de material que se depositarán encima, y no deformarse a causa de la gravedad o por la fusión de capas sucesivas.^{124,125} En ese sentido, las tintas con comportamiento termorreversible también resultan convenientes por su rápida velocidad de gelificación, mediada por el cambio de temperatura entre el extrusor y la cama de impresión. Para todas las tintas que experimentan una transición de sol-gel, $\tan(\delta)$ también es un parámetro importante. Los geles fuertes, que están unidos covalente o iónicamente, tienen valores de $\tan(\delta)$ por debajo de 0,1. Esta alta resistencia del gel ayuda a mantener la forma del objeto impreso, pero también puede provocar una extrusión inconsistente debido a la fractura del gel al pasar por la boquilla. Por el contrario, los geles débiles tienen un $\tan(\delta)$ mayor que 0,1 y, aunque pueden mostrar una extrusión más uniforme, el fluido también puede colapsar al depositarse. De ese modo, se requiere un equilibrio entre distintos factores para que la imprimibilidad sea apta.¹³¹

Para valorar todas las características de una tinta y evaluar su potencial uso en impresión 3D, es necesario llevar a cabo una serie de ensayos en un equipo especial para tal fin, el

reómetro: un instrumento de precisión que aplica y mide amplios rangos de esfuerzo, deformación y velocidad de deformación.

1.4.2.1. *Ensayos prácticos para la caracterización reológica*

Curvas de flujo

El ensayo más básico en reología es la determinación de la viscosidad (μ) y del esfuerzo cortante (τ) aplicando una velocidad de corte ($\dot{\gamma}$) creciente, normalmente entre 0,01 y 1000 s^{-1} , y a una temperatura fija y constante. A partir de los datos del ensayo se obtiene el reograma o curva de flujo de la tinta, mediante el cual se puede determinar el comportamiento del material (pseudoplástico, dilatante, viscoplástico), realizar ajustes al modelo matemático más adecuado e interpretar el significado de los parámetros obtenidos.

Tixotropía y velocidad de recuperación

La tixotropía es una propiedad dependiente del tiempo que permite caracterizar cuán reversibles son los cambios producidos en la estructura interna de un gel. En los fluidos tixotrópicos, la viscosidad aparente disminuye al aplicar una velocidad de corte constante en el tiempo y vuelve a recuperarse progresivamente al disminuir o cesar esa fuerza sobre el fluido. Este fenómeno se mide a través de pruebas de recuperación tras distintas velocidades de cizallamiento, a temperatura constante, conocidas como *Stepped Flow Method* (SFM).

El ensayo consta de tres etapas diferentes: en la primera, se aplica una velocidad de corte baja (sobre 0,4 s^{-1}) durante 120-180 s; seguidamente, se aplica una velocidad de corte alta (sobre 100 s^{-1}) durante 20-40 s y, finalmente, vuelve a aplicarse una velocidad de corte baja durante 120-180 s más. Con esta variación de esfuerzos aplicados sobre el material, se puede valorar cuánto y de qué modo se destruye la estructura interna de la tinta, y determinar también el porcentaje de regeneración de ésta a distintos tiempos.

Viscoelasticidad: determinación de LVR, γ_c , τ_0 y $\tan(\delta)$

Para medir la viscoelasticidad se realizan, comúnmente, dos ensayos oscilatorios de baja amplitud (SAOS) diferentes que permiten evaluar los dos parámetros principales: módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdidas (G'').

El primero de los ensayos que realizar es un barrido de esfuerzo o amplitud para estimar la región viscoelástica lineal (LVR) y poder llevar a cabo, posteriormente, el barrido de frecuencias. El barrido de esfuerzo se obtiene tras someter a la muestra a un intervalo de deformación (de 0,1 a 100%) y a una frecuencia fija (normalmente, entre 0,1 y 3 Hz).

La LVR indica el rango en el que se puede realizar un ensayo mediante reometría oscilatoria sin destruir la estructura de la muestra. El valor límite de la región LVR, también llamado límite de linealidad o punto de deformación crítica (γ_c), es el valor de la amplitud del esfuerzo a partir del cual los valores del módulo de almacenamiento dejan de ser aproximadamente constantes (Figura 1.4-11). El punto de deformación crítica (γ_c) suele determinarse como el primer punto en el que G' tiene un valor igual o inferior al 90% de su valor inicial.¹³² La extensión de la LVR, además, también se relaciona de forma inversamente proporcional con el carácter sólido de la muestra: a menor extensión, mayor solidez.^{121,133,134}

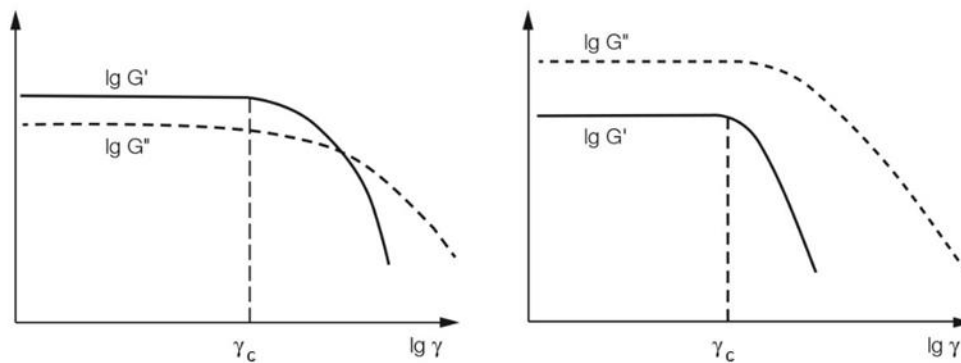


Figura 1.4-11. Aspecto del barrido de esfuerzo para determinar la LVR. Extraído de (Anton Paar GmbH, 2021).

Los barridos de esfuerzo también pueden ser útiles para la determinación del umbral de fluencia (τ_0) cuando no es posible hacerlo a través de las curvas de flujo, como en el caso de materiales que tienen alta viscosidad a temperatura ambiente. En este tipo de fluidos, con el aumento del esfuerzo de corte se produce un deslizamiento de la muestra entre los platos, y el umbral de fluencia medido es menor al real de la muestra.^{133,135}

Así pues, en un barrido de esfuerzo se puede estimar τ_0 mediante dos métodos. El primer método utiliza la intersección de las tangentes del módulo de almacenamiento a tensiones oscilatorias altas y bajas (Figura 1.4-12). La primera línea se ajusta a los valores dentro de la LVR y la segunda deriva del módulo de almacenamiento medido para tensiones que exceden la LVR.^{46,136} Sin embargo, existe cierta ambigüedad en la elección del número de puntos necesarios para obtener la Línea 2, lo que reduce la solidez del método.

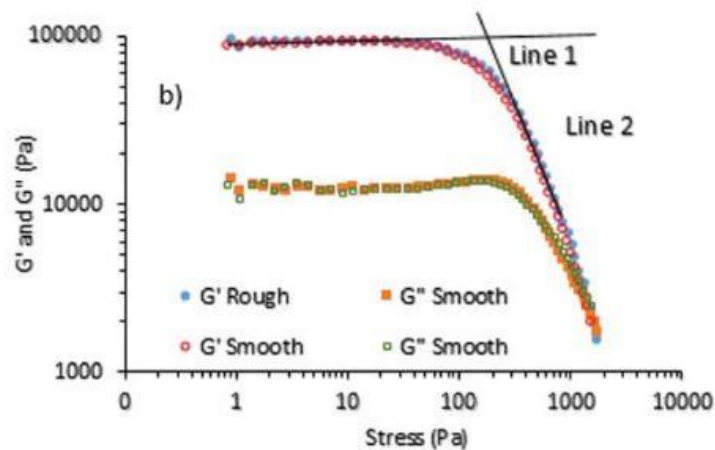


Figura 1.4-12. Determinación de la tensión umbral mediante intersección de tangentes. Extraído de (Cyriac et al., 2015).

En el segundo método, se utiliza una gráfica que representa deformación oscilatoria (%) frente al esfuerzo (Pa) (Figura 1.4-13).

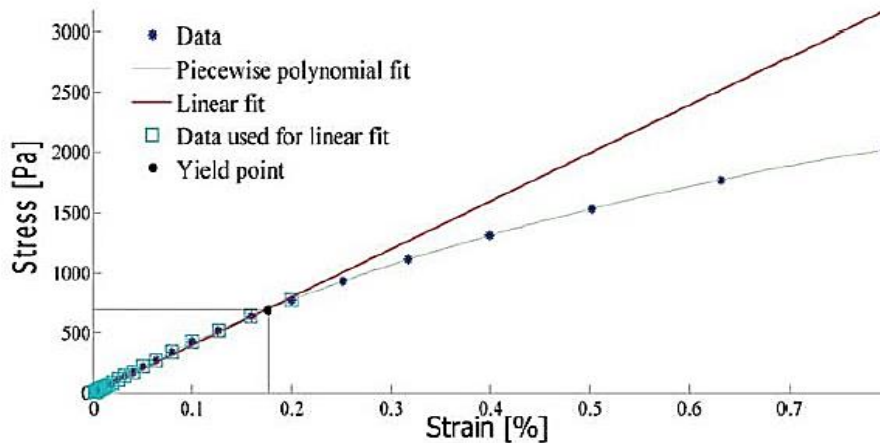


Figura 1.4-13. Procedimiento utilizado para determinar el umbral de fluencia a partir de la gráfica esfuerzo - deformación oscilatoria. Extraído de (Cyriac et al., 2015).

La curva de esfuerzo-deformación es lineal a baja deformación ya que la respuesta del fluido es predominantemente elástica. El punto donde la curva comienza a desviarse de la linealidad se determina como el umbral de fluencia.^{46,136} Es importante mencionar que el valor de τ_0 que se obtiene es diferente según el método que se utiliza, por eso se debe hacer referencia a él como umbral de fluencia aparente.¹³⁵

Finalmente, el segundo de los ensayos SAOS a realizar es el barrido de frecuencia. En este caso, la amplitud de deformación es constante (y su valor ha de estar dentro de la

LVR), pero la frecuencia de oscilación aumenta. Este ensayo ayuda a comprender mejor la estructura interna del material y el comportamiento dependiente del tiempo. Por ejemplo, las altas frecuencias representan un comportamiento a corto plazo, como el ocasionado en un proceso de mezcla o extrusión, mientras que las bajas frecuencias representan un comportamiento a largo plazo, como el asentamiento o el reposo.^{46,125} Mediante los barridos de frecuencia se pueden evaluar el valor de $\tan(\delta)$ para cada fluido y su variabilidad en función de la frecuencia angular.

1.4.3. Evaluación del efecto de la reticulación en la rigidez de las impresiones

Las propiedades mecánicas en términos de rigidez de las estructuras 3D se pueden examinar con precisión mediante reología oscilatoria. Es posible determinar el módulo de elasticidad (G') y, por tanto, la rigidez de una muestra, sometiéndola a un intervalo de deformación (*strain* %) a una frecuencia fija.

Este ensayo tiene especial relevancia en el caso de la bioimpresión, pues las propiedades biomecánicas de un tejido varían notablemente entre órganos y tejidos y están intrínsecamente relacionadas con su función. Los tejidos mecánicamente estáticos, como el cerebro o los tejidos adaptables, como el pulmón, presentan una rigidez baja, mientras que los tejidos expuestos a cargas mecánicas elevadas, como el hueso o el músculo esquelético, presentan módulos elásticos con una rigidez que es varios órdenes de magnitud mayor (Figura 1.4-14).¹³⁷ En esa línea, se ha demostrado que tanto las propiedades bioquímicas como las biomecánicas de las tintas influyen en la compatibilidad celular y tisular. Por ejemplo, ensayos realizados con condrocitos han revelado que la rigidez del hidrogel que los encapsula tiene importancia tanto en la distribución y organización celular como en la secreción de colágeno tipo II, esencial para la reparación de defectos del cartílago articular.¹³⁸ Otros informes han demostrado que las células proliferan más rápido cuando crecen en la superficie de hidrogeles de alta resistencia y, sin embargo, cuando las células se cultivan en un microambiente 3D, su supervivencia y su proliferación es menor a medida que aumenta la fuerza de la matriz.¹³⁹

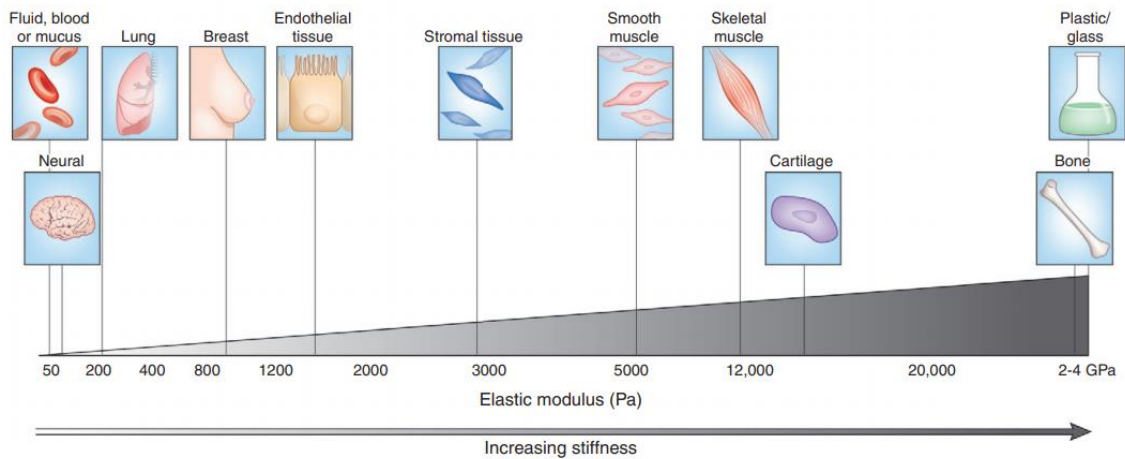


Figura 1.4-14. Variación en la rigidez de los tejidos. Extraído de (Cox & Erler, 2011).

De ese modo, es conveniente realizar este ensayo en las tintas involucradas en procesos de bioimpresión cuya firmeza puede ser modulada mediante de reacciones de reticulación y que tienen contacto con cargas celulares: (i) de forma directa, al contener células embebidas en su interior o servir de soporte o andamio para su siembra o (ii) de forma indirecta, al estar ideadas para ser implantadas en el organismo.

Uno de los protocolos más habituales para valorar de forma práctica la rigidez de los sistemas formulados y/o impresos es el descrito por Cox y Madsen,¹⁴⁰ donde las muestras son sometidas a barridos de esfuerzo con un intervalo pequeño de deformación (de 0,2 a 2% aproximadamente), lográndose extraer el valor del módulo de almacenamiento (G') al 1% para comparar múltiples medidas de una misma tinta, múltiples tintas, múltiples estructuras o cualquier combinación que resulte de interés.

Capítulo 2.

Impresión de matrices tridimensionales para el cultivo de células tumorales

2.1. Introducción y motivaciones

El cáncer es el principal problema sociosanitario y la segunda causa de muerte a nivel mundial: con casi 10 millones de fallecimientos en 2020, se proyecta un crecimiento del 30% en la aparición de nuevos casos para el 2030.^{141,142} Se estima que el cáncer cuesta anualmente a la sociedad española alrededor de 19.300 millones de euros —siendo el paciente y su familia quienes asumen el 45% del coste total— por lo que su impacto económico y social es muy elevado.¹⁴³



Figura 2.1-1. Coste total anual del cáncer a la sociedad española. Extraído de (Asociación Española contra el Cáncer (AECC), 2020).

El cáncer es una enfermedad por la que algunas células del organismo se multiplican de manera incontrolada y adquieren la capacidad de invadir tejidos diferentes de aquel en el que se originó el tumor. No obstante, existen más de 200 tipos diferentes de cáncer. Cada uno de ellos posee características clínicas y moleculares particulares, en ocasiones totalmente distintas a otros cánceres, por lo que a menudo se consideran enfermedades independientes con sus causas, su evolución y su tratamiento específico.¹⁴⁴ Por ese motivo, el mecanismo de aparición y desarrollo del cáncer todavía no se comprende completamente, afectando gravemente al pronóstico y al tratamiento de la enfermedad.

El cultivo celular es una herramienta ampliamente utilizada para el estudio *in vitro* de la biología celular, la morfología de los tejidos o los mecanismos de las enfermedades. En la mejora de la comprensión del desarrollo y la progresión del cáncer, los modelos de cultivo celular bidimensionales (2D) han desempeñado un papel importante. No obstante, es bien sabido que esos sistemas no representan con precisión los ecosistemas tumorales ni recapitulan de manera estricta las interacciones celulares que tienen lugar en los complejos tejidos cancerosos.^{145,146} Las células de los tejidos sanos se encuentran en posiciones más o menos fijas y los procesos de división, diferenciación y muerte celular se encuentran regulados de forma muy precisa, con un balance equilibrado. Sin embargo, cuando las células sufren transformaciones genéticas y pierden su capacidad de regular los procesos fisiológicos, pueden transformarse en células tumorales y romper el equilibrio existente. Las células tumorales adquieren la capacidad de proliferar de forma incontrolada, escapan a la inhibición del crecimiento, resisten a la apoptosis celular, inducen angiogénesis (formación de vasos sanguíneos), activan los mecanismos de invasión y migración y forman un tejido tumoral con capacidad metastática.^{147,148} En los tejidos cancerosos, a pesar de la formación de nuevos vasos sanguíneos, la disponibilidad de oxígeno y nutrientes se encuentra muy limitada lo que genera un microambiente tisular muy heterogéneo al que las células tumorales se adaptan para continuar su proceso proliferativo e invasivo. Estos mecanismos de adaptación al ecosistema tumoral generan una gran heterogeneidad celular y, por ello, las células cultivadas en monocapas (2D) — con acceso ilimitado a los ingredientes del medio (oxígeno, metabolitos, factores de crecimiento...)— no permiten imitar ese entorno tumoral real.^{146,149,150}

En los últimos años, los avances en el desarrollo de biomateriales (naturales y sintéticos) con propiedades fisicoquímicas ajustables han promovido el empleo de nuevos métodos en la ingeniería de tejidos. Especialmente, el desarrollo de la tecnología de bioimpresión ha allanado el camino de la investigación *in vitro* del cáncer a través del empleo de diferentes modelos tumorales tridimensionales. La bioimpresión ofrece un método automatizado, preciso y repetible de posicionamiento tridimensional de las células en estructuras con una forma y arquitectura definidas, siendo particularmente útil para imitar el microambiente tumoral.^{48,96,151–153} El uso de tumores bioimpresos en 3D está aumentando en áreas como la biología del cáncer —en el estudio de la iniciación tumoral, la migración, la invasión y la metástasis—, así como en el cribado y validación de nuevos fármacos, incluso brindando la posibilidad de realizar investigaciones específicas para

cada paciente que deriven en una medicina personalizada (Figura 2.1-2).^{147,154,155} Sin embargo, la construcción de modelos tumorales *in vitro* supone un gran desafío y requiere un trabajo sólido en la formulación de las tintas biomateriales —llamadas biotintas cuando contienen células embebidas en la composición— y en el análisis de su reología. La investigación de la combinación correcta de biomateriales, células y otros componentes para formar un hidrogel imprimible juega un papel clave en la posterior obtención de figuras con alta precisión y fidelidad de forma, además de con una suficiente viabilidad celular.^{96,156}

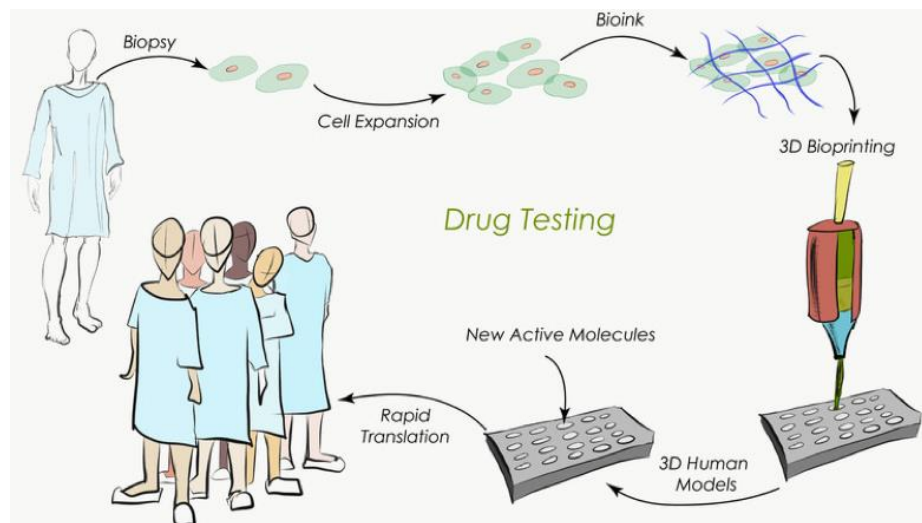


Figura 2.1-2. La bioimpresión 3D en el descubrimiento de nuevos fármacos. Extraído de (Forget & Dagarville, 2017).

A su vez, estas estructuras biomateriales deben permitir tanto las interacciones entre las células y el microambiente como la transmisión de señales entre ellas, para poder estudiar de forma eficiente las características biológicas de los tumores o evaluar los efectos de un tratamiento farmacológico.¹⁵⁷

De ese modo, el diseño de la arquitectura apropiada y la generación de tintas biocompatibles para SSE, aptas para el crecimiento y la observación de células tumorales, son los pilares fundamentales de este capítulo. En este punto, merece una especial mención el trabajo colaborativo realizado con las investigadoras Dra. María Dolores Chiara y Lucía Celada, del Área de Investigación en Cáncer de Cabeza y Cuello de la Fundación para la Investigación e Innovación Biomédica en el Principado de Asturias (FINBA), gracias al cual se ha podido llevar a cabo esta investigación y realizar validaciones *in vitro* de las tintas biomateriales y los modelos 3D impresos.

2.2. Objetivos

Los objetivos definidos para este capítulo se detallan a continuación:

1. Transformar un medio de cultivo celular líquido en una tinta biomaterial apta para ser impresa mediante SSE.

Partiendo de los componentes básicos de un medio de cultivo utilizado para la siembra en placa (cultivo 2D), seleccionar y combinar componentes adicionales biocompatibles que aporten imprimibilidad a la mezcla para generar una tinta que permita la adquisición de estructuras tridimensionales con alta repetitividad, precisión y consecución de forma.

2. Generar matrices tridimensionales de tinta biomaterial y observar la viabilidad, el crecimiento y el comportamiento celular.

Sembrar distintos tipos de células tumorales sobre las matrices impresas para validar la aptitud de la composición y analizar la conducta celular al ser cultivadas en un entorno tridimensional.

3. Fabricar modelos tridimensionales de células embebidas.

Generar biotintas finales con las que imprimir los modelos tumorales y estudiar el comportamiento de las células encapsuladas en la propia matriz 3D.

2.3. Selección de componentes y obtención de las tintas biomateriales y biotintas

Para conseguir imprimir los modelos tumorales tridimensionales, era preciso generar unas tintas biomateriales/biotintas con unas características concretas:

- a) Una composición a base de materiales biocompatibles y con unas propiedades fisicoquímicas (pH, osmolaridad...) aptas para el crecimiento y la viabilidad de las células.
- b) Unas propiedades reológicas adecuadas al proceso de impresión 3D y dentro de un rango de temperaturas que no comprometan la supervivencia de las células.
- c) Unas características fisicoquímicas que permitan la construcción de estructuras tridimensionales que resistan las condiciones de cultivo (temperatura, humedad, presencia de medios de cultivo específicos...) durante un periodo de tiempo largo y suficiente como para estudiar el comportamiento celular y su evolución.

2.3.1. Descripción de los materiales seleccionados

Tomando como base las premisas anteriores, se planteó la estrategia de adaptar un medio de cultivo utilizado de forma rutinaria para el cultivo de células en placa para conseguir una tinta biomaterial/biotinta imprimible. Para lograrlo, por un lado, se escogió una composición de medio de cultivo rico en colágeno y con los elementos necesarios para la correcta supervivencia de las células (aminoácidos, vitaminas, iones...). Por otro lado, se seleccionaron determinados hidrocoloides —polímeros naturales solubles en agua que se encuentran abundantemente en la naturaleza—, biocompatibles y de amplio uso en las áreas de la ingeniería de tejidos, para otorgar una reología adecuada a la mezcla.

Los materiales empleados y sus características se describen brevemente a continuación:

Colágeno tipo I

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano (representa el 25% de la proteína corporal total) y es el componente principal de la matriz extracelular, proporcionando la forma y dotando de fuerza y flexibilidad a los tejidos (Figura 2.3-1).

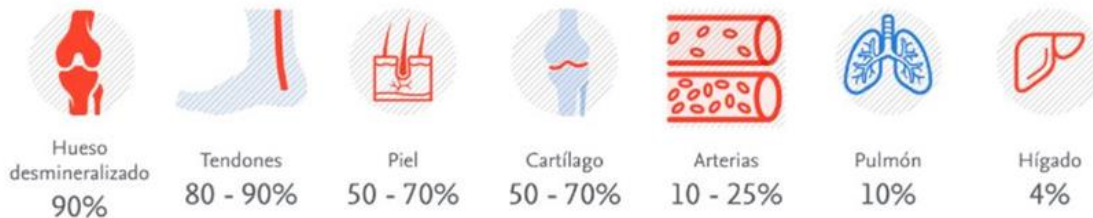


Figura 2.3-1. Contenido aproximado de colágeno en diferentes tejidos. Extraído de (Elsevier Connect, 2019).

El ser humano tiene 42 genes que codifican cadenas polipeptídicas —conocidas como cadenas α — que dan lugar a 28 tipos de colágenos diferentes.¹⁵⁸ Las moléculas de colágeno están compuestas por tres cadenas α que se asocian entre sí formando la “triple hélice de colágeno”: una superestructura básica consistente en una hélice dextrógira triple, regular y rígida (Figura 2.3-2). Presente en gran proporción en los tejidos conectivos fuertes y resistentes, pueden formar fibrillas (tipos I, II, III, V, VII, XI...); extensas redes (tipos IV, VI, VIII...) o cumplir otras funciones especializadas.^{158,159}

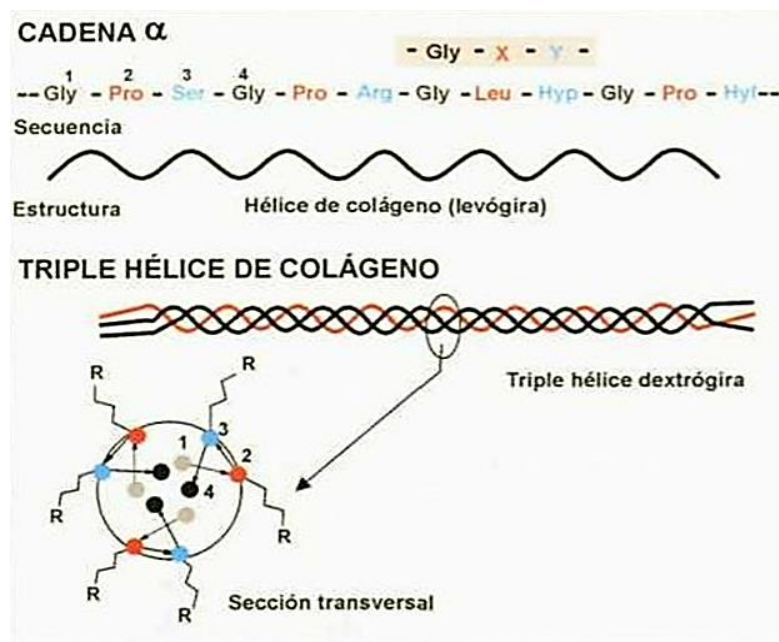


Figura 2.3-2. Características de la molécula de colágeno. Extraído de (Lizarbe, 2001).

El colágeno tipo I fue el primero en ser caracterizado debido a su abundancia en tejidos ricos en tendones, como la cola de rata. Por el hecho de que se pueda extraer en grandes cantidades y por su biocompatibilidad, el colágeno tipo I de cola de rata se ha estudiado ampliamente como material natural en el campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.¹⁶⁰

El proceso de obtención consiste en aislar los tendones de las colas de rata, extraerles el colágeno y disolver las fibras en ácido acético. La sustancia gelatinosa resultante se puede congelar o liofilizar y se conserva en perfecto estado de 12 a 18 meses.¹⁶¹ También se pueden adquirir preparados comerciales, listos para su uso inmediato, en forma de suspensión en ácido acético y con una concentración variable entre 8 - 11 mg/ml. Cuando se trabaja con este tipo de preparados líquidos, el colágeno debe mantenerse a temperaturas de 2 °C a 8 °C o, de lo contrario, empieza a polimerizar, la suspensión densifica y resulta altamente dificultoso pipetear volúmenes correctos o generar mezclas homogéneas al combinarlo con otros componentes. Además de la temperatura, la concentración de colágeno, la fuerza iónica y el pH alteran su polimerización. En condiciones normales de cultivo (37 °C y pH ~7,4), un gel de colágeno de concentración de 2 mg/ml genera una red tridimensional homogénea, altamente reticulada y con un tamaño de poro pequeño. Al reducir la temperatura de polimerización o el pH, el tamaño de los poros aumenta, la matriz se vuelve heterogénea y las fibrillas de colágeno se vuelven más gruesas.¹⁶²

El uso del colágeno tipo I en el tándem bioimpresión 3D - ingeniería de tejidos ha sido ampliamente estudiado, empleado normalmente en combinación otros coloides como quitosán, gelatina, alginato o agarosa para poder adaptar las propiedades físicas de los hidrogeles, simular tejidos diana o incluso para reducir el coste general del uso de colágeno en solitario.^{132,163-166}

Gelatina

La gelatina es un hidrocoloide de tipo proteico, producido mediante hidrólisis básica o ácida del colágeno, que implica la ruptura de la estructura de hélice triple del colágeno para dar lugar a cadenas polipeptídicas ordenadas al azar. Tiene una temperatura de transición, por encima de la cual las moléculas de gelatina se encuentran libres y de forma aleatoria en solución, pero al enfriarse por debajo de esta temperatura, las cadenas de aminoácidos

comienzan a formar hélices triples, que pueden inducir la formación de redes tridimensionales dando lugar a la gelificación.^{131,167}

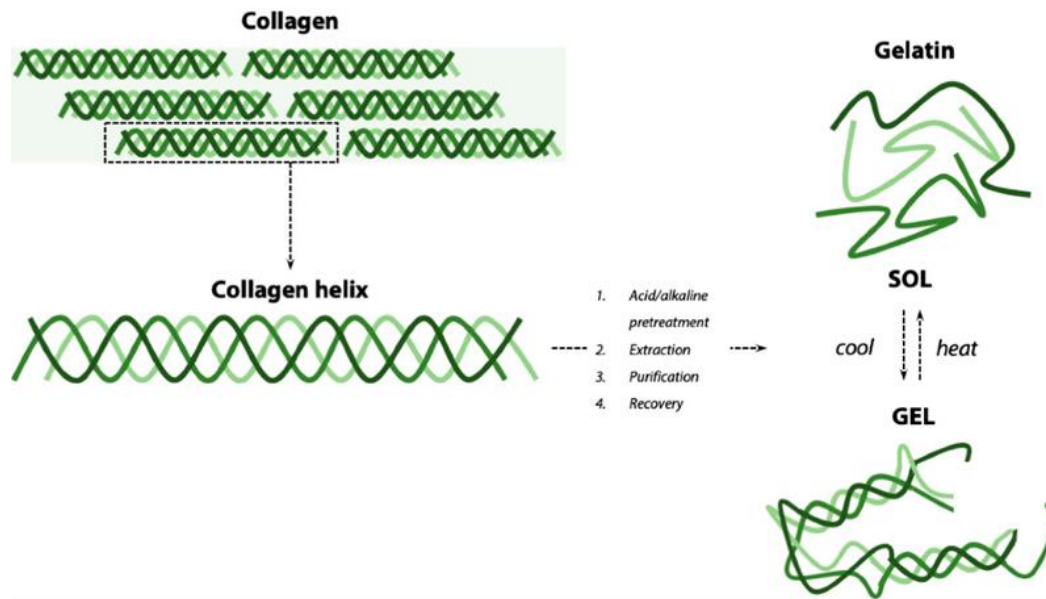


Figura 2.3-3. Procesamiento de colágeno para extracción de gelatina. Extraído de (Campiglio et al., 2019).

Sin embargo, no todas las gelatinas son iguales. Se clasifican según sea su tipo de procesado (tipo A, para las que se obtienen mediante el procesamiento ácido de la materia prima, y tipo B, para el procesamiento alcalino) y según su fuerza gelificante, que se mide por su índice Bloom y tiende a dividirse en tres categorías: bajo (<150), medio (150-225) y alto (225-300).¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ Cuanto más alto es el número de Bloom, mayor es su poder gelificante.

Es un material ampliamente utilizado, debido a su bajo coste y gran disponibilidad, pues se obtiene a partir del colágeno procedente de la piel y de los huesos de origen bovino y porcino. Al tratarse de un compuesto rico en proteína (84-90%) y sin grasa, colesterol, conservantes ni aditivos, es de gran interés en el sector de la alimentación y la repostería. En la industria farmacéutica, la gelatina se emplea principalmente para la elaboración de cápsulas blandas o duras, así como para el recubrimiento de vitaminas o la formulación de cosméticos.^{171,172} La gelatina también es conocida por su idoneidad como biopolímero para bioimpresión 3D debido a sus numerosas ventajas: fácil preparación y manipulación, biocompatibilidad, biodegradabilidad, bajo coste, la facilidad de modificación de su composición química para la obtención de derivados (como la gelatina metacrilada), aporte

de características elásticas a los hidrogeles...^{173,174} Además, retiene las secuencias bioactivas del colágeno del cual deriva (como el tripéptido de arginina-glicina-ácido aspártico, también llamado RGD), lo que puede mejorar el comportamiento celular a la vez que exhibe una antigenicidad limitada.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Distintas combinaciones de gelatina con otros componentes biocompatibles (alginato sódico, quitosan, agarosa, ácido hialurónico...) han sido desarrolladas en numerosos estudios previos para aplicaciones en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa, liberación de fármacos, etc.¹⁷⁷⁻¹⁸⁰ Sin embargo, la transición gel-sol que la gelatina experimenta a temperatura fisiológica (pasa de estado sólido a estado líquido a temperaturas alrededor de 37 °C), hace que resulte imprescindible llevar a cabo una reacción de reticulación (química, lumínica, pH-dependiente...) en las estructuras impresas cuando estas son destinadas, por ejemplo, al cultivo celular o la ingeniería de tejidos, evitando así un rápido deterioro y la consecuente destrucción del impreso.^{174,181,182}

Alginato

El alginato es un polisacárido aniónico presente ampliamente en las paredes celulares de las algas marinas pardas. Comercialmente disponible como una sal sódica del ácido algínico, está compuesto por ácido β -D-manurónico y unidades de ácido α -L-gulurónico dispuestas en bloques de poli(manuronato) y poli(guluronato) (Figura 2.3-4).¹⁸³

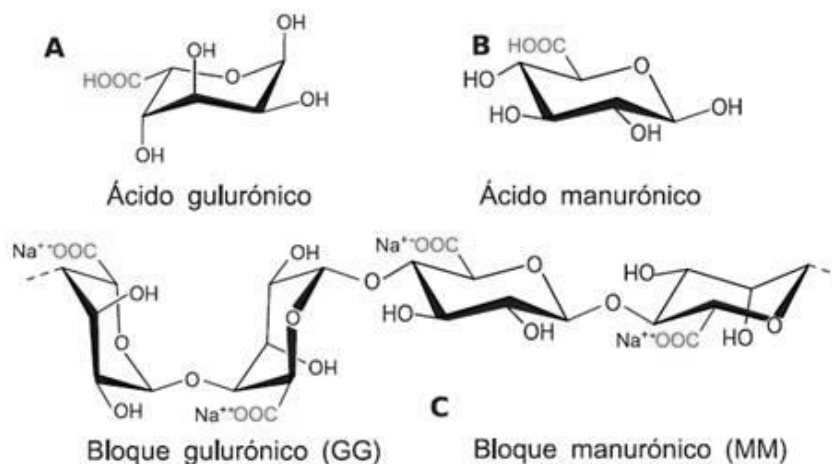


Figura 2.3-4. Ácido gulurónico (A), ácido manurónico (B) y bloques gulurónicos y manurónicos que componen el alginato (C). Extraído de (Ore B. et al., 2020).

La gelificación del alginato puede inducirse rápidamente mediante transferencia multicatiónica en diversas posiciones, siendo la porción poli(guluronato) la causante de este empaquetamiento conocido como modelo “caja de huevos” (Figura 2.3-5).^{181,184} De ese modo, los geles de alginato pueden formarse en frío, y su consistencia depende del contenido de tramos de poligulurónico.¹⁸⁵

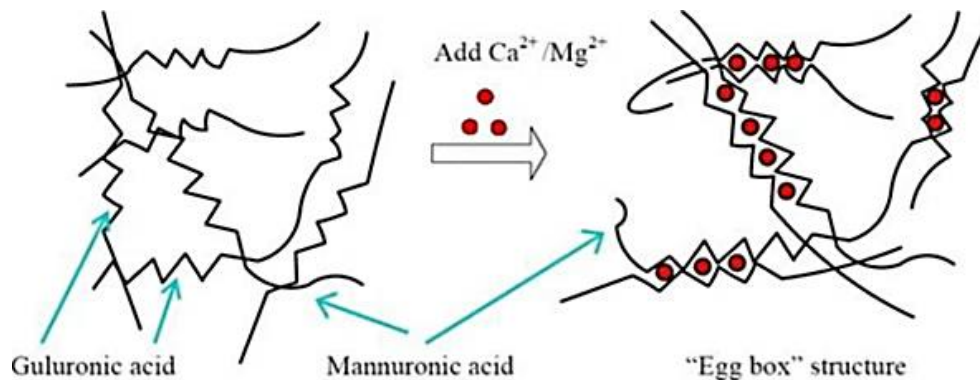


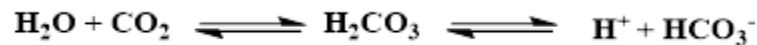
Figura 2.3-5. Gelificación de una solución de alginato con la adición de iones de calcio o magnesio. Extraído de (Wan et al., 2008).

Debido a su buena biocompatibilidad, biodegradabilidad, excepcional retención de agua y propiedades de gelificación ajustables, los alginatos se han estudiado ampliamente como soportes blandos en diversas aplicaciones de ingeniería de tejidos, y como microcápsulas para la administración de fármacos, entre otras.^{163,178} Sin embargo, generalmente el alginato no promueve una unión celular eficiente pues carece de sitios de adhesión celular, lo que conduce a interacciones muy pobres entre el material celular y puede limitar las funciones celulares. Además, los hidrogeles constituidos únicamente a base de alginato son frágiles y mecánicamente inestables, lo que limita significativamente su uso como biomaterial en muchas aplicaciones.¹⁷⁴ Por estos motivos, es conveniente combinar el alginato sódico con otros materiales biocompatibles, como por ejemplo el colágeno o la gelatina, para mejorar la adhesión celular y las propiedades mecánicas y reológicas del hidrogel.¹⁸¹

Medios de cultivo celular

Los medios de cultivo celular son mezclas complejas de sales, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, precursores metabólicos, factores de crecimiento, hormonas y oligoelementos. Los requisitos para estos componentes varían entre las líneas celulares;

por ese motivo, existe una gran cantidad de formulaciones de medios de cultivo específicos. Un suplemento esencial del medio de cultivo es el suero bovino fetal (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) que contiene un elevado contenido de factores de crecimiento y escasa cantidad de anticuerpos. Los carbohidratos se suministran principalmente en forma de glucosa. En algunos casos, la glucosa se reemplaza con galactosa para disminuir la acumulación de ácido láctico, ya que la galactosa se metaboliza a un ritmo más lento.¹⁸⁶ Otras fuentes de carbono incluyen aminoácidos (particularmente L-glutamina) y piruvato. Además de los nutrientes, el medio ayuda a mantener el pH y la osmolaridad en un sistema de cultivo. Las células producen, y requieren, pequeñas cantidades de dióxido de carbono para su crecimiento y supervivencia. El CO₂ se disuelve en el medio líquido y reacciona con el agua para formar ácido carbónico:



A medida que las células metabolizan y producen CO₂, el pH del medio decrece y el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la derecha. El rojo de fenol se agrega al medio para monitorear colorimétricamente los cambios en el pH (Figura 2.3-6).

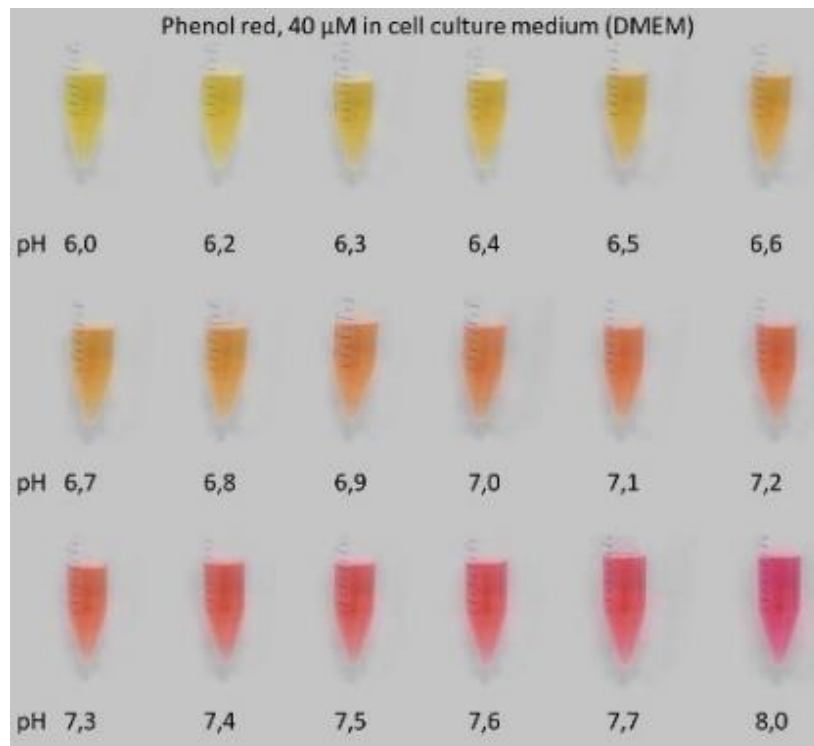


Figura 2.3-6. Escala colorimétrica del rojo de fenol. (CC BY-SA 4.0, vía Wikimedia Commons).

Durante el crecimiento celular, el medio cambia de color a medida que cambia el pH debido a los metabolitos liberados por las células. A niveles bajos de pH, el rojo fenol vuelve el medio amarillo, mientras que a niveles de pH más altos se vuelve púrpura medio. Para la mayoría de los trabajos de cultivo de tejidos, el medio debe ser de color rojo brillante (pH 7,4). Para conseguirlo, se suplementa con uno o más sistemas tamponadores como el bicarbonato de sodio, el buffer de fosfatos (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) o el ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES, del inglés *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*) o bien se regula el nivel de CO₂ presente en la atmosfera sobre el cultivo. El sistema tampón empleado en el medio debe adaptarse al sistema de cultivo: si se trata de un sistema abierto, donde hay libre intercambio de la atmósfera inmediatamente por encima del medio con la atmósfera de la incubadora, o de un sistema cerrado, donde las dos atmósferas se mantienen separadas. En ausencia de sistemas tamponadores, las células en cultivo pueden estar sujetas a estrés metabólico y acidosis, que induce la muerte celular.

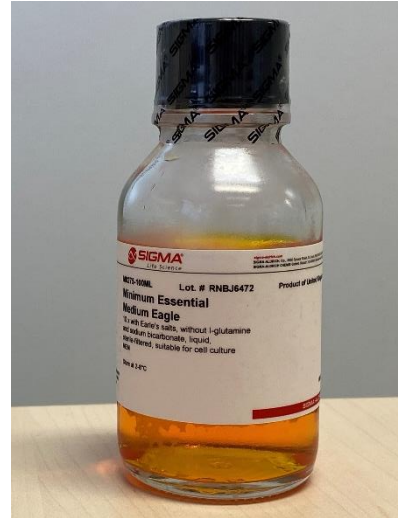
En la misma línea, el control de la osmolaridad es esencial cuando se trabaja con células vivas, pues las membranas plasmáticas de las células dejan pasar más o menos agua en función de la concentración de solutos a ambos lados de la membrana. Si las células son trasladadas a un medio hipertónico se deshidratarán, ya que el agua se transportará al lado donde hay mayor concentración de solutos. Si por el contrario se colocan células en un medio hipotónico, las células absorberán líquido hasta lisarse. Para la mayoría de las células de vertebrados, los medios de cultivo suelen diseñarse de modo que la osmolaridad se mantenga en un rango entre 260 mOsm/kg y 320 mOsm/kg, básicamente para imitar la osmolaridad sérica a 290 mOsm/kg.¹⁸⁷

Medio Esencial Mínimo (MEM)

El Medio Esencial Mínimo (MEM), desarrollado por Harry Eagle, es uno de los medios de cultivo celular sintéticos más utilizados. El MEM se compone de solución salina equilibrada de Earle (una solución tampón isotónica con sales inorgánicas y un carbohidrato como fuente de energía) y de aminoácidos, para que el medio se aproxime a la composición de proteínas de las células de mamíferos.¹⁸⁸ Es un medio simple que a menudo se fortifica con suplementos adicionales o niveles altos de suero. Con el tiempo, ha habido numerosas variaciones en la fórmula del MEM en función de sus aplicaciones. De forma concreta, el MEM empleado en este capítulo tiene las especificaciones siguientes:

Tabla 2.3-1. Composición del medio de cultivo MEM empleado.

Descripción	Medio Esencial Mínimo de Eagle, concentración 10x, con sales de Earle, sin L-glutamina ni bicarbonato sódico, líquido, estéril, apto para cultivo celular.
Referencia del producto	M0275
Marca de producto	SIGMA
pH	5.1 - --.5
Glucosa	9.0 - 11.0 g/l
Piruvato sódico	No
Rojo fenol	Sí
Sales de Earle (%CO₂)	Sí
NaHCO₃	No
HEPES	No
L-glutamina	No



Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)

El medio DMEM (del inglés *Dulbecco's Eagle's medium*), otro de los medios de cultivo celular ampliamente utilizados, tiene aproximadamente el doble de concentración de aminoácidos y cuatro veces la cantidad de vitaminas que MEM, así como nitrato férrico, piruvato de sodio y algunos aminoácidos suplementarios (aunque no todos los aminoácidos no esenciales).¹⁸⁶

Existen muchas formulaciones comerciales de DMEM, por ejemplo, con glucosa alta o baja, con o sin glutamato, etc. La formulación original de DMEM contenía un nivel bajo (1 g/l) de glucosa y de piruvato de sodio (0,11 g/l). Posteriormente, cuando se determinó que las células crecen mejor en medio modificado con un nivel alto (4,5 g/l) de glucosa, el piruvato pasó a considerarse opcional.¹⁸⁹

El DMEM empleado en este capítulo tiene la siguiente composición:

Tabla 2.3-2. Composición del medio de cultivo DMEM empleado.

Descripción	Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), concentración 1X, alto contenido en glucosa, L-glutamina, líquido, estéril, apto para cultivo celular
--------------------	--

Referencia del producto	41965039
Marca de producto	Gibco
pH	7,0 - 7,4
Glucosa	4,5 g/l
Piruvato sódico	No
Rojo fenol	Sí
NaHCO₃	Sí
HEPES	No
L-glutamina	Sí
Osmolalidad	320 a 360 mOsm/kg



Buffer de fosfatos (PBS)

El buffer de fosfatos, PBS o buffer fosfato salino es una solución amortiguadora e isotónica, cuya función es mantener el pH y la presión osmótica similar al ambiente fisiológico. El PBS está compuesto por una combinación de sales tales como cloruro de sodio, fosfato de sodio, cloruro de potasio y fosfato de potasio.¹⁹⁰ Por ello, se utiliza el buffer PBS para protocolos de laboratorio que requieren el mantenimiento de células *in vitro* o para la criopreservación de estas.

En esta Tesis, se ha utilizado como medio líquido para la preparación de parte de las tintas un PBS comercial (Corning™, Mediatech, Inc., USA) que contiene 0,2 g/l de cloruro de potasio, 0,2 g/l de dihidrógeno fosfato de potasio, 8 g/l de cloruro de sodio y 1,15 g/l de fosfato disódico, sin calcio ni magnesio, y con un pH entre 7,3 y 7,5.

2.3.2. Preparación de las tintas biomateriales/biotintas

Las características intrínsecas de los materiales seleccionados impedían realizar una mezcla *one-pot* de los componentes, pues la gelatina necesita calentamiento para fundirse y el colágeno se coagula fácilmente por encima de los 37 °C si no está correctamente disuelto. En esa línea, se planteó una metodología específica para la preparación de las biotintas obtenidas mediante la combinación final, en distintas proporciones, de dos fórmulas preparadas de forma independiente y denominadas como parte A y parte B (Tabla 2.3-3).

Tabla 2.3-3. Composición de las partes de la formulación y ratios de mezcla.

Fórmulas			
Parte A	Colágeno (tipo I)	23% (v/v)	
	MEM (10x)	10% (v/v)	
	NaHCO ₃ (solución al 7,5%)	7% (v/v)	
	Suspensión células en DMEM o DMEM sin células	60% (v/v)	
Parte B	Alginato sódico	6% (p/p)	
	Gelatina (tipo A)	16% (p/p)	
	PBS	78% (p/p)	
Mezclas	3:1	1:1	1:3
Parte A	3	1	1
Parte B	1	1	3

La parte A, por un lado, estaba constituida por un medio de cultivo líquido rico en colágeno en el cual se podían incluir las células de forma sencilla, sin comprometer su supervivencia ni su viabilidad. Por otro lado, la parte B la formaba un hidrogel elaborado con alginato de sodio, gelatina tipo A y PBS como disolvente con la finalidad de aportar imprimibilidad a las mezclas. Se probaron tres relaciones volumétricas diferentes de parte A y parte B con el propósito de estudiar su reología y seleccionar la más adecuada para la bioimpresión de los modelos.

Protocolo de formulación

Parte A

En la preparación de biotintas (tintas cargadas con células) primero se procede a la obtención de la suspensión celular a partir de un cultivo celular al 80-90% de confluencia y a la determinación de su concentración en células.

Si se trata de líneas celulares en suspensión, puede realizarse el conteo de forma directa. En cambio, si se trata de células adherentes, se requiere la reparación de una suspensión celular mediante el protocolo que se describe a continuación. Primero, se aspira el medio de cultivo y se hacen dos lavados con PBS para eliminar el medio de cultivo que contiene una elevada concentración de proteínas presentes en el suero bovino fetal. Seguidamente se añade tripsina-ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) 0,05%, que cataliza la proteólisis de las proteínas de membrana que participan en la adhesión de las células a las superficies

de las placas de cultivo. Las células se incuban en la placa durante unos 3-5 minutos a 37 °C o hasta que se observe el desprendimiento de las células de la placa de cultivo. Posteriormente se añade, como mínimo, el mismo volumen de medio de cultivo con FBS para inactivar la tripsina. Se recoge toda la suspensión celular en un tubo y se centrifuga a 1300 rpm durante 3 minutos. Después del centrifugado, se elimina el sobrenadante y el pellet de células se resuspende en medio de cultivo fresco.

Para el conteo celular, se utiliza una cámara de Neubauer y una alícuota de la suspensión celular. La cámara Neubauer dispone de cuatro cuadrados de 1 mm de lado, cada uno dividido en dieciséis cuadrados más pequeños (Figura 2.3-7). Por encima de la cámara se coloca un cubreobjetos de manera que cubra totalmente la cuadrícula de conteo, se añaden lentamente 10 μ l de la suspensión celular mezclados 1:1 con una solución de azul tripán entre el cubreobjetos y la cámara de recuento colocando la micropipeta en el borde del cubreobjetos.

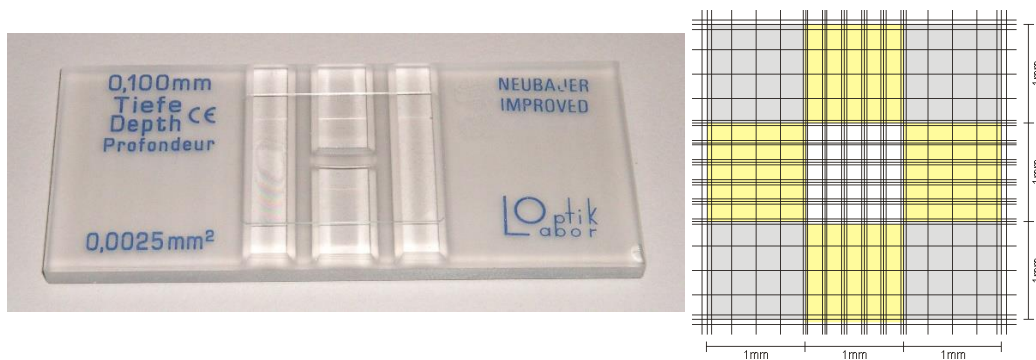


Figura 2.3-7. Cámara de Neubauer (izda.) y retículo de conteo (dcha.). (CC BY-SA 4.0, vía Wikimedia Commons).

El azul tripán es un colorante que se introduce en las células que presentan la membrana dañada. De ese modo, las células que aparecen teñidas de color azul son consideradas no viables mientras que las células viables no se tiñen de azul y se ven refringentes y con un brillo verdoso en la membrana. Se deben contar las células de los 4 cuadrantes y calcular el número medio de células, realizando el conteo en zigzag siguiendo la cuadrícula para evitar contar dos veces la misma célula (Figura 2.3-8).

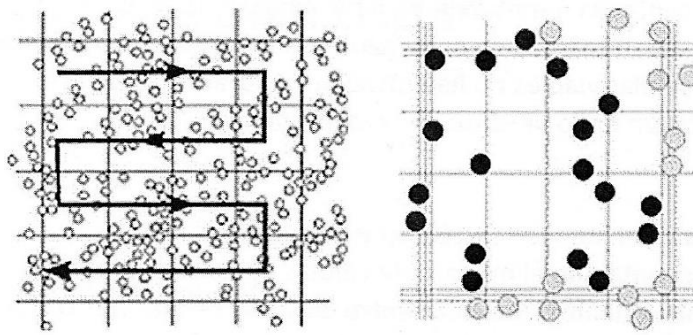


Figura 2.3-8. Esquemas de protocolo de conteo en zigzag (izda.) y de visualización de células viables y no viables (dcha.).

Teniendo en cuenta que el espacio habilitado entre la cámara y el cubreobjetos tiene 0,1 mm de altura, el volumen de líquido que se aloja en cada cuadrado es de 1 mm x 1 mm x 0,1 mm, es decir, 10^{-4} cm³. Por tanto, la concentración de células de la suspensión equivaldrá al número promedio de células contadas en los cuatro cuadrantes, multiplicado por 10^4 y por el factor de dilución (que en el caso de una dilución 1:1 con solución de azul tripán, equivale a 2). Una vez calculada la concentración de células de la suspensión, se transfiere a un nuevo tubo el volumen de suspensión con la cantidad de células que queremos introducir en la biotinta, el cual se centrifuga, se elimina el sobrenadante y de nuevo se resuspende en el volumen de DMEM final que se incluirá a la parte A.

Los ingredientes que componen la parte A, se añaden y mezclan con la pipeta directamente en el cuerpo de la jeringuilla tipo luer-lock compatible con la impresora 3D (Figura 2.3-9).

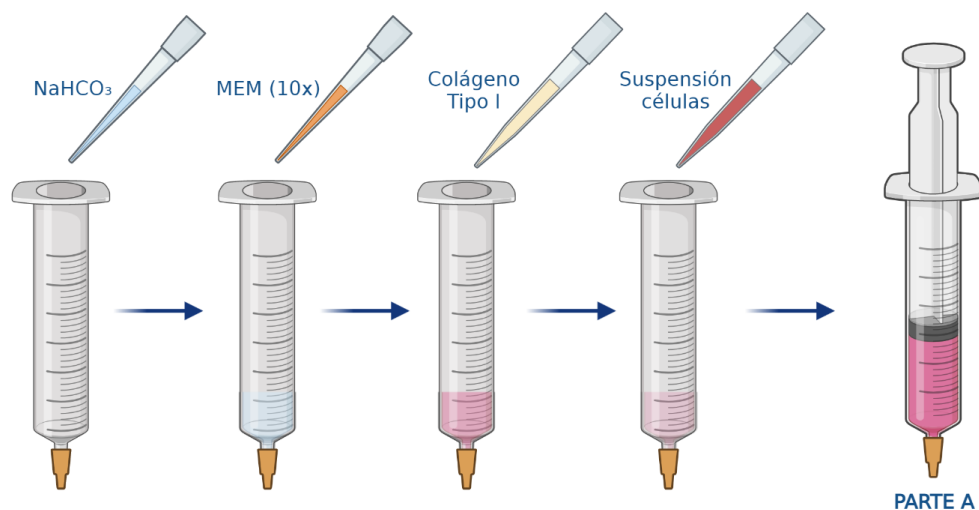


Figura 2.3-9. Protocolo de formulación de la parte A de la biotinta.

En el estudio exploratorio de las tintas, focalizado en encontrar la combinación de materiales más adecuada para ser impresa, el volumen correspondiente a la suspensión celular se añadió de DMEM sin células, buscando obtener un comportamiento reológico y resultados de impresión lo más cercanos posible a las tintas finales, pero sin desperdiciar material biológico.

Parte B

Para elaborar la parte B, en primer lugar, se pesa la gelatina, se hidrata con la mitad de la cantidad de PBS y se calienta en un baño a 40 ± 2 °C. Mientras tanto, la cantidad requerida de alginato de sodio se mezcla con agitación en el volumen restante de PBS. Una vez que la gelatina está totalmente fundida, se añade paulatinamente sobre la solución de alginato mezclando suavemente hasta su completa incorporación. Luego, se deja reposar en el baño a 40 ± 2 °C durante toda la noche para eliminar el mayor número de las burbujas de aire que se hayan podido incorporar en el hidrogel. Si se requiere, pueden ser eliminadas empleando un baño de ultrasonidos (Figura 2.3-10).

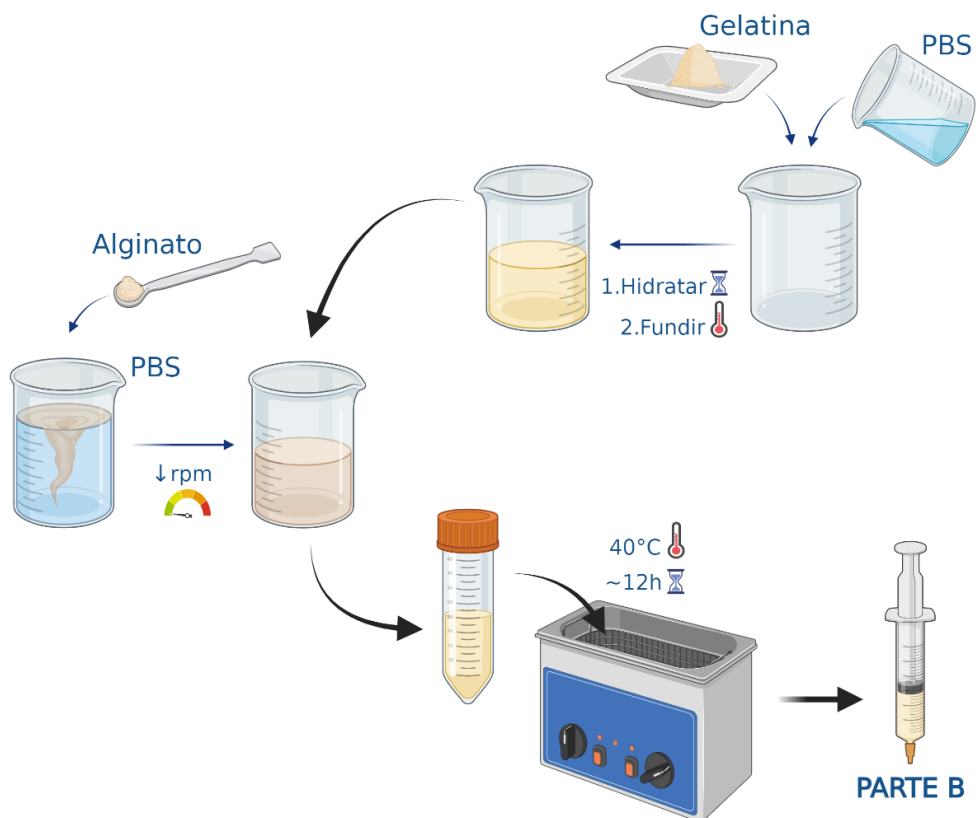


Figura 2.3-10. Protocolo de formulación de la parte B de la biotinta.

Combinación parte A + parte B

Para preparar las biotintas finales, los volúmenes de parte A y parte B correspondientes se transfieren a sendas jeringas, que se unen con un conector de transferencia tipo hembra-hembra. Mediante el suave movimiento de los émbolos, se combina el contenido de cada jeringuilla y se mezcla hasta que se obtiene una tinta homogénea (Figura 2.3-11). Finalmente, se retiran el conector y la jeringa vacía y se enroscan tapones de plástico en las aberturas de las boquillas para evitar la pérdida de material. Las jeringas se mantienen en un baño a 30 ± 2 ° C hasta su uso.



Figura 2.3-11. Detalle de las jeringuillas con parte A (izda.) y parte B (dcha.) unidas con el conector de transferencia tipo hembra-hembra.

2.4. Análisis reológico de las tintas

2.4.1. Materiales y métodos

La caracterización reológica de las diferentes tintas desarrolladas en esta Tesis se ha llevado a cabo utilizando un reómetro híbrido (Discovery HR-2, TA Instruments, USA) equipado con un sistema plato-plato (25 mm de diámetro) y con un sistema de control de temperatura (Environmental Test Chamber, ETC, TA Instruments, USA). Cada uno de los ensayos se ha realizado por triplicado y se han representado gráficamente los promedios de los resultados. Los datos han sido procesados empleando el software asociado al equipo (TRIOS Rheology Software, TA Instruments, USA).

Para proceder con el análisis de las tintas, se atemperaron en un baño a 25 °C previamente a la medición y se utilizaron espátulas de plástico para cargar un volumen de muestra aproximadamente de 0,2 ml por ensayo. Las muestras se descartaron después de cada prueba. Con el objeto de asegurar el mismo grado de relajación estructural y una temperatura correcta y uniforme en la muestra, todos los ensayos estuvieron precedidos de un tiempo de equilibrado de 30 segundos.

Las curvas de flujo se realizaron aumentando la velocidad de corte de forma constante desde 0,01 hasta 100 s⁻¹ en 120 s a 25 °C. Paralelamente, los datos del reograma se ajustaron a distintos modelos matemáticos empleando el propio software de visualización de datos del reómetro.

La tixotropía se midió mediante un ensayo SFM, aplicando una velocidad de corte de 0,4 s⁻¹ durante 120 s en la primera y en la última etapa, mientras que en la etapa central se aplicó una velocidad de cizallamiento de 100 s⁻¹ durante 40 s. La regeneración estructural se determinó como el porcentaje de la viscosidad obtenida después de la aplicación de la segunda etapa, con respecto a la viscosidad media obtenida en los 40 últimos segundos de la primera etapa, donde la viscosidad consigue su valor en equilibrio.

El comportamiento viscoelástico se estudió a través de los ensayos SAOS básicos. Primero, un barrido de esfuerzo con un intervalo de deformación de 0,1 a 1000% y a una

frecuencia fija de 1 Hz, para la determinación de la LVR. Finalmente, un barrido de frecuencia de 0,1 a 10 rad/s a una deformación fija dentro de la LVR, para asegurar que la prueba se realiza sin perturbar la estructura de la muestra.

2.4.2. Resultados

2.4.2.1. Curvas de flujo

La Figura 2.4-1 muestra las curvas de flujo de las mezclas testadas. En este caso, no se representaron en escala logarítmica para poder apreciar las diferencias claras que existían entre los perfiles de las diferentes combinaciones.

En el reograma se observó un mayor comportamiento pseudoplástico (disminución pronunciada de la viscosidad con el aumento de la velocidad de corte) cuanto más contenido de parte B había en la composición. Por el contrario, la mezcla 3:1 tenía un comportamiento casi newtoniano, representado por líneas rectas tanto para el esfuerzo como para la viscosidad y que permanecían prácticamente constantes independientemente del valor de la velocidad de corte.

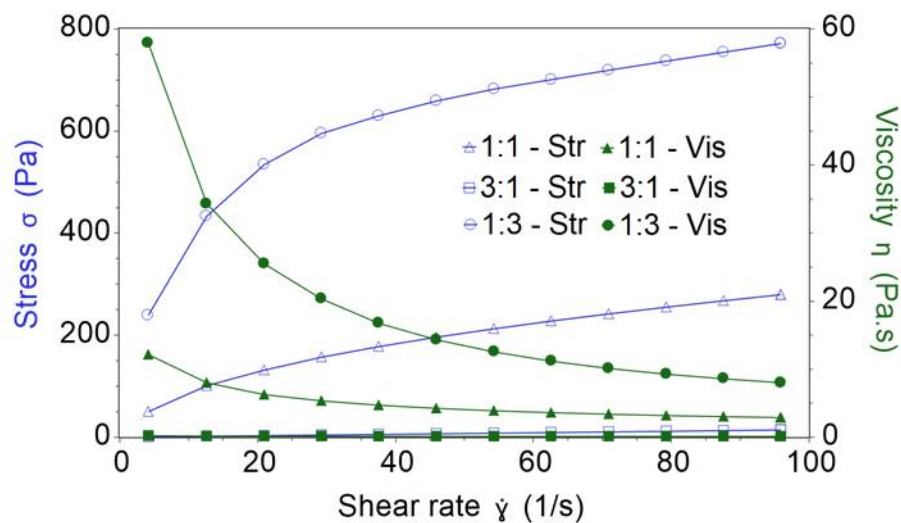


Figura 2.4-1. Reogramas de las tintas biomateriales a 25 °C.

En la Tabla 2.4-1 se muestran los resultados obtenidos del ajuste de los valores experimentales a los tres modelos matemáticos y los coeficientes de correlación correspondientes. Aunque los valores de R^2 para todos los modelos fueron cercanos a uno,

los valores negativos del umbral de fluencia (τ_0) y de la viscosidad a velocidad de corte infinita (μ_∞), en los modelos de Herschel-Bulkley y Sisko respectivamente, hicieron que estos modelos se descartasen y se seleccionó la Ley de Potencia como el más apropiado para representar los datos.¹⁹¹

Aplicando este modelo, se obtuvo un índice de flujo (n) con valor cercano a 1 para la tinta 3:1, corroborando el comportamiento prácticamente newtoniano observado en el gráfico. Del mismo modo, se confirmó el marcado carácter pseudoplástico de la tinta 1:3, con el menor valor de n entre las tres. Asimismo, el índice de consistencia (K) resultó próximo a 0 Pa·sⁿ para la tinta con comportamiento newtoniano y para las tintas pseudoplásticas, el valor de K aumentó al hacerlo la proporción de parte B en la mezcla.

Tabla 2.4-1. Ajuste de los valores experimentales a los modelos matemáticos seleccionados.

Modelo	Fórmula	K (Pa·s ⁿ)	n	τ_0 (Pa)	μ_∞ (Pa·s)	R ²
Ley de potencia	1:1	28,30	0,50	-	-	0,9986
	3:1	0,19	0,94	-	-	0,9982
	1:3	249,46	0,25	-	-	0,9944
Herschel-Bulkley	1:1	46,32	0,42	-33,14	-	1,0000
	3:1	0,11	1,06	0,71	-	0,9998
	1:3	844,29	0,12	-658,87	-	0,9985
Sisko	1:1	23,40	0,67	-	-2,31	0,9994
	3:1	0,47	0,06	-	0,14	0,9930
	1:3	128,09	0,58	-	-11,22	0,9983

2.4.2.2. Tixotropía y velocidad de recuperación

El ensayo SFM permitió observar el efecto en la viscosidad de la aplicación de una velocidad de corte pequeña y constante (Etapa 1) frente a una velocidad de corte mayor (Etapa 2), y la regeneración de la estructura del hidrogel al reducir de nuevo la cizalla aplicada (Etapa 3).

Tal y como puede apreciarse en la Figura 2.4-2 ninguna de las mezclas recuperó en gran proporción la estructura interna del gel después de someterlo a una alta velocidad de corte a 25 °C. Las líneas correspondientes a la velocidad de cizalla se superponen para los tres resultados, asegurando la aplicación del mismo patrón de velocidades en las diferentes tintas. Se encontraron porcentajes similares para las fórmulas 1:1 y 1:3: alrededor del 35% y 50% de la viscosidad recuperada tras 40 y 120 s, respectivamente (Figura 2.4-3 y Tabla

2.4-2). De forma previsible, los porcentajes fueron incluso más bajos para la tinta 3:1 al contener menor cantidad de parte B, la cual contribuye en gran medida a generar la red estructural interna de la mezcla a través sus hidrocoloides.

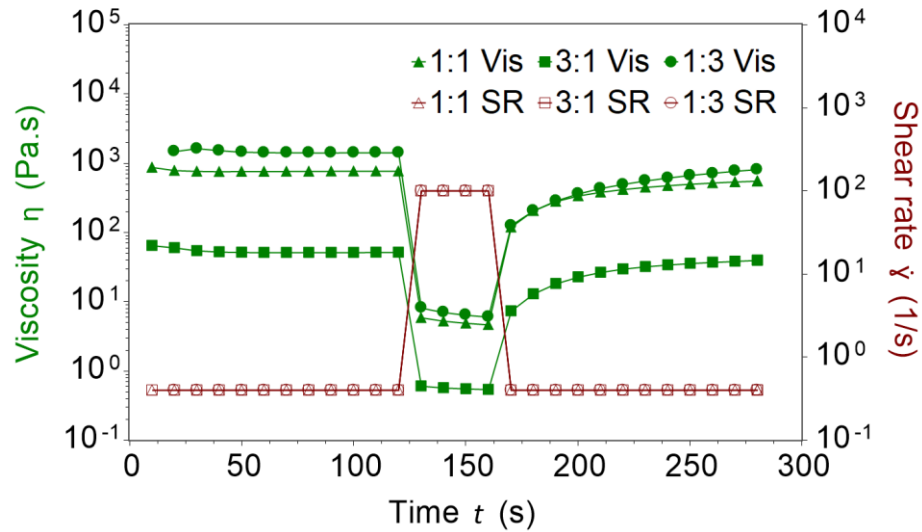


Figura 2.4-2. Ensayo SFM para evaluación de la tixotropía de las tintas biomateriales.

Tabla 2.4-2. Disminución y recuperación de la viscosidad calculados a distintas etapas del ensayo.

	ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3	
	Disminución de μ (%)	Disminución de μ (%)	Recuperación de μ (%)	
			40 s	120 s
1:1	11,88	99,33	34,52	51,82
3:1	3,93	99,51	19,94	35,55
1:3	20,39	98,90	34,11	54,08

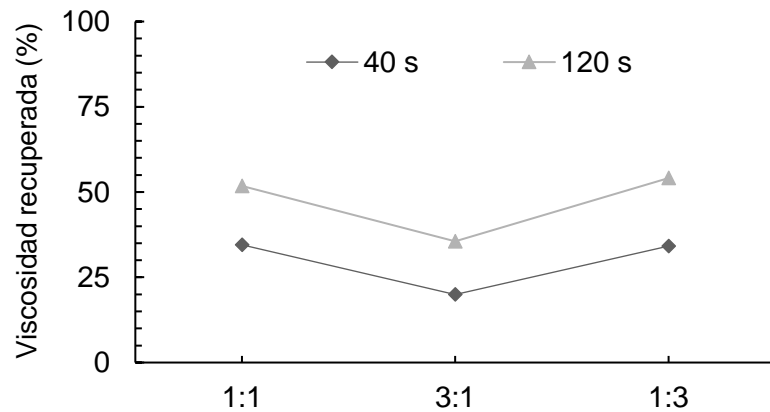


Figura 2.4-3. Representación de los porcentajes de recuperación de la viscosidad calculados transcurridos 40 s y 120 s desde la segunda etapa (100 s^{-1}).

Los porcentajes bajos de recuperación representan fluidos que, una vez extruidos, tardan mucho tiempo en recuperar su estructura interna y su viscosidad inicial. Este comportamiento podría resultar problemático en la etapa de impresión, pues los trazos depositados no mantendrían su forma y tenderían a derramarse o expandirse sobre la superficie. Sin embargo, al tratarse de una tinta con carácter termorreversible, este punto débil de las tintas pudo ser contrarrestado mediante la aplicación de una baja temperatura en la plataforma de impresión, obligando a la gelatina a gelificar de forma inmediata al contacto con el soporte de impresión y generando trazos con muy buena resolución. En cualquier caso, es importante mencionar que después de una ruptura de la estructura interna de un fluido tixotrópico, la recuperación de esta nunca es del 100%, pues hay una parte de energía consumida en la descomposición de esa red estructural (tal y como se pudo observar en los clásicos circuitos de histéresis).¹¹⁶

2.4.2.3. Barridos de esfuerzo: determinación de LVR, γ_c y τ_0

Los barridos de esfuerzo de las distintas mezclas, adquiridos a 25 °C de temperatura y a una frecuencia de 1 Hz, se muestran en la Figura 2.4-4. La evaluación de los módulos elástico y viscoso en la región LVR reflejó valores de G' mayores que G'' , de modo que las tres tintas presentaban una estructura similar a un gel, típica de un material sólido viscoelástico.

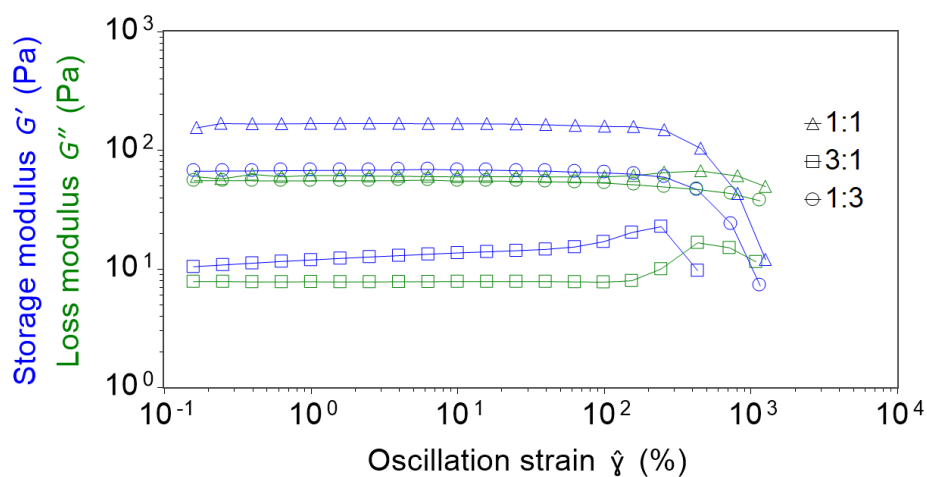


Figura 2.4-4. Barridos de esfuerzo de las tintas biomateriales.

Por otro lado, las tres tintas tienen LVR largas, con valores de deformación crítica (γ_c) entre 430-450% (Tabla 2.4-3), rasgo característico de hidrogeles con un marcado carácter líquido.

Tabla 2.4-3. Valores de deformación crítica (γ_c) para las tintas biomateriales.

	1:1	3:1	1:3
γ_c (%)	455,56	432,81	430,85

Gracias a los datos extraídos de los barridos de esfuerzo se pudo también realizar la determinación del umbral de fluencia (τ_0), mediante el método basado en la representación de estos en un gráfico esfuerzo - deformación oscilatoria (Figura 2.4-5 y Tabla 2.4-4).

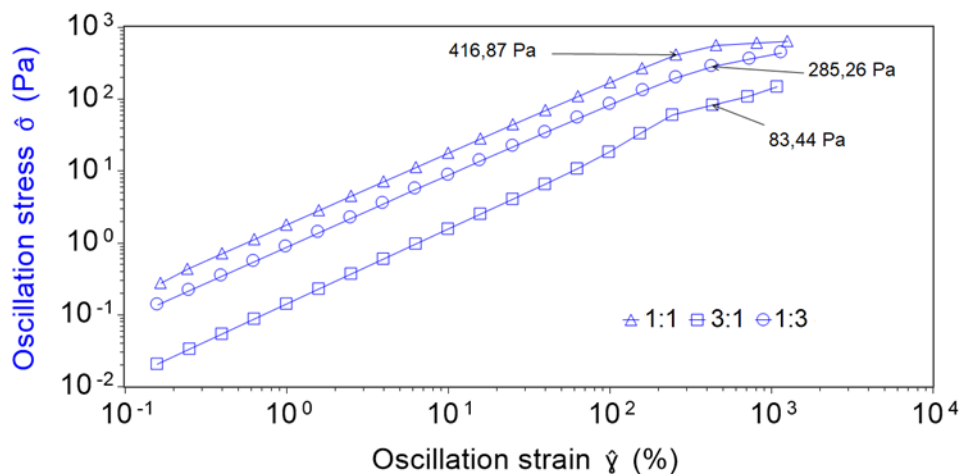


Figura 2.4-5. Determinación gráfica de τ_0 para las diferentes tintas biomateriales.

Tabla 2.4-4. Valores de umbral de fluencia (τ_0) obtenidos.

	1:1	3:1	1:3
τ_0 (Pa)	416,87	83,44	285,26

Mientras que los valores de deformación crítica tienen un orden de magnitud parecido, los umbrales de fluencia resultaron totalmente distintos en función de la composición, siendo la mezcla 3:1 la que requiere un esfuerzo menor para empezar a fluir.

2.4.2.4. Barridos de frecuencia: evaluación de $\tan(\delta)$.

Del mismo modo que en los barridos de amplitud, los barridos de frecuencia exhibieron un comportamiento típico de gel débil ($G' > G''$) en las tres formulaciones, siendo la mezcla 1:1 aquella con valores de G' más altos (Figura 2.4-6).

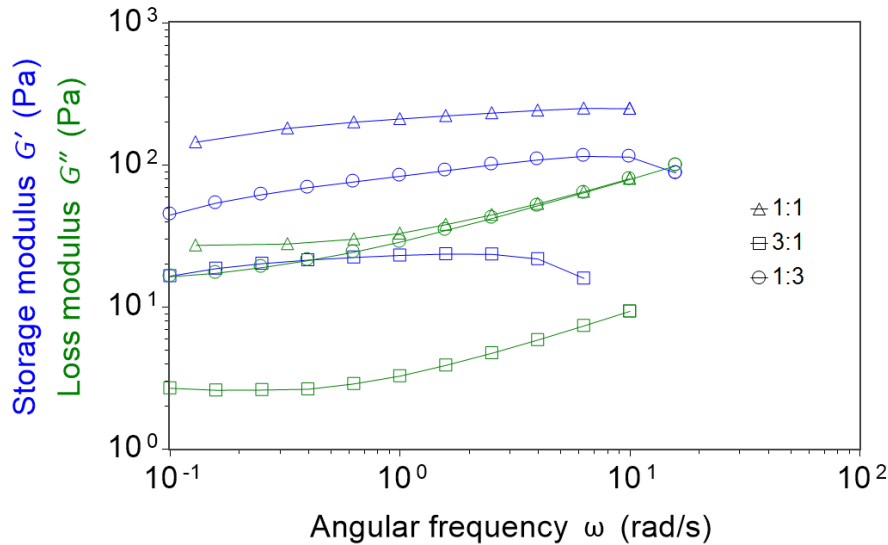


Figura 2.4-6. Barridos de frecuencia para las tintas 1:1, 3:1 y 1:3.

El examen de la tangente de pérdidas o $\tan(\delta)$ reveló un comportamiento más líquido para la mezcla 3:1, con valores alrededor de 0,4 (Figura 2.4-7). Los valores para las mezclas 1:1 y 1:3 oscilaron entre 0,1 y 0,2. Sin embargo, la mezcla con más cantidad de parte B mostró una mayor dependencia de la frecuencia angular, volviéndose más líquida a medida que esta aumentaba. Este dato corroboraba los resultados anteriores, demostrando el mayor carácter pseudoplástico de esta composición frente al resto.

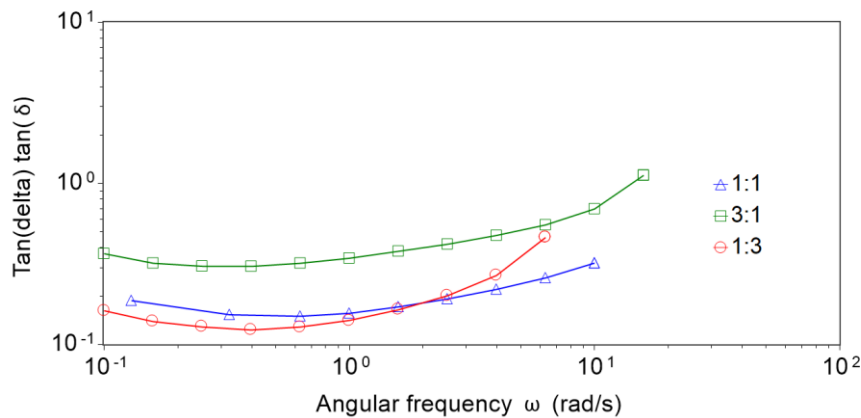


Figura 2.4-7. Comparativa de la variación de la tangente de pérdidas con respecto a la frecuencia para las tintas 1:1, 3:1 y 1:3.

Tras realizar todos ensayos reológicos y analizar los resultados, se seleccionó la relación volumétrica más adecuada para la bioimpresión de los modelos 3D. Valorando el comportamiento pseudoplástico, la capacidad de recuperación tras la extrusión y las propiedades viscoelásticas extraídas de los ensayos oscilatorios se escogió la proporción 1:1. Por un lado, la mezcla 3:1 resultó un hidrogel demasiado débil y con una deposición difícil de controlar al presentar porcentajes de recuperación de la viscosidad muy bajos y un valor de $\tan(\delta)$ mayor. Por otro lado, 1:1 y 1:3 obtuvieron valores de recuperación y de $\tan(\delta)$ similares y, comparativamente, ambas pudieran ser buenas candidatas para su impresión. Sin embargo, al ser tintas que poca recuperación post-extrusión, el carácter pseudoplástico más pronunciado en 1:3 y la mayor dependencia de la frecuencia angular detectada al evaluar su $\tan(\delta)$ pudieran resultar rasgos problemáticos en el proceso de impresión, generando una mayor variabilidad de resultados frente a una tinta con valores más estables como 1:1. Por último, es preciso mencionar que la facilidad en la preparación de la tinta 1:1 (volúmenes sencillos de calcular, combinación rápida de ambas partes en el proceso de mezcla, menor formación de burbujas...) también resultó condicionante en la decisión final.

2.5. Evaluación de la rigidez de la tinta biomaterial y selección del tiempo de reticulación

Una vez seleccionada la tinta con las mejores propiedades reológicas para ser utilizada en la creación de las matrices tridimensionales para el cultivo de células tumorales, se realizó un estudio de la rigidez de esta en función de los minutos de exposición a una solución de CaCl_2 al 0,5% (p/v). Conociendo que las propiedades biomecánicas de las tintas influyen en aspectos tan relevantes como la viabilidad o en el comportamiento celular, se investigó una combinación de tinta y tiempo de exposición que generara hidrogeles que permitieran a las células sembradas una interacción con —o incluso, invasión de— la matriz. En la misma línea, se quiso posibilitar la motilidad de las células cuando estuvieran embebidas en la tinta, de modo que se pudieran distribuir, dividir, expandir o agrupar con libertad por el interior de la estructura una vez impresa. En contraposición, la reticulación debía ser lo suficientemente efectiva como para permitir el mantenimiento de la estructura tridimensional y la observación prolongada en el tiempo de las matrices en condiciones de cultivo comunes (37 °C, 5% CO_2), pues la finalidad de estos materiales era la creación de entornos tridimensionales para el estudio del comportamiento celular.

2.5.1. Materiales y métodos

Primero, se formularon las partes A y B de la tinta y se mezclaron siguiendo el protocolo establecido. Una vez obtenida la tinta 1:1, se depositó 1 ml en un recipiente con tapa de polietileno de 10 ml, asegurando la no presencia de burbujas (Figura 2.5-1A). Los recipientes se taparon y sellaron con Parafilm, y se mantuvieron refrigerados a 4 °C un mínimo de dos horas.

De forma previa a la medición o la reticulación en la solución de CaCl_2 , se atemperaron los hidrogeles dejándolos durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. En el caso de las muestras reticuladas, una vez superado el tiempo de exposición correspondiente (2 o 5 min) (Figura 2.5-1-B), se lavaron con agua desionizada para evitar que la solución de CaCl_2

residual continuara endureciendo el hidrogel durante la realización del ensayo. Para esta evaluación se prepararon nueve muestras, tres para cada tiempo de reticulación (0 min, 2 min y 5 min).

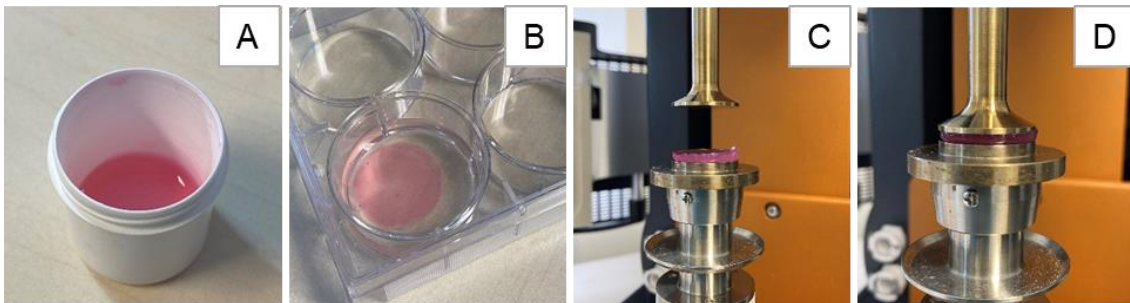


Figura 2.5-1. Medición de la rigidez de la tinta 1:1 a distintos tiempos de reticulación: (A) preparación del hidrogel en recipiente, (B) reticulación con CaCl_2 , (C) colocación de la muestra en el plato del reómetro, (D) ajuste del plato superior.

Para proceder con el ensayo reológico, se colocó cuidadosamente el hidrogel a medir en el plato inferior del reómetro con la ayuda de una espátula (Figura 2.5-1-C). En este caso, a diferencia del protocolo marcado por Cox y Madsen y mencionado en la sección 1.4.3,¹⁴⁰ el molde y el plato empleados eran del mismo diámetro, de modo que resultó suficiente con ajustarlo adecuadamente en el centro del plato sin dañarlo. De no ser así, el gel debería ser recortado con punzón de biopsia al tamaño correcto para que evitar que sobresaliese o colgase por fuera del área delimitada por el plato. Finalmente, se movió el plato superior hacia abajo hasta ajustarlo con la superficie superior del gel (Figura 2.5-1-D) y se inició el barrido de amplitud para medir el módulo elástico (G') de la muestra.

2.5.2. Resultados

Los resultados de los barridos de amplitud realizados a los hidrogeles a tiempo de reticulación 0, 2 y 5 minutos en un intervalo de oscilación entre 0,2 y 2% se recopilan en la Figura 2.5-2. Los hidrogeles mostraron una respuesta viscoelástica lineal e independencia de la frecuencia dentro del rango de prueba, pues los valores del módulo almacenamiento y del módulo de pérdidas se mantuvieron prácticamente constantes.

Al extraer el valor de G' al 1% de oscilación (Tabla 2.5-1) se observó un gran aumento de la rigidez con la aplicación de solución de CaCl_2 durante dos minutos, casi quintuplicando el módulo elástico respecto al gel sin reticular. El aumento de la rigidez resultó

proporcionalmente menor entre los 2 min y los 5 min, llegando a los 2800 Pa aproximadamente.

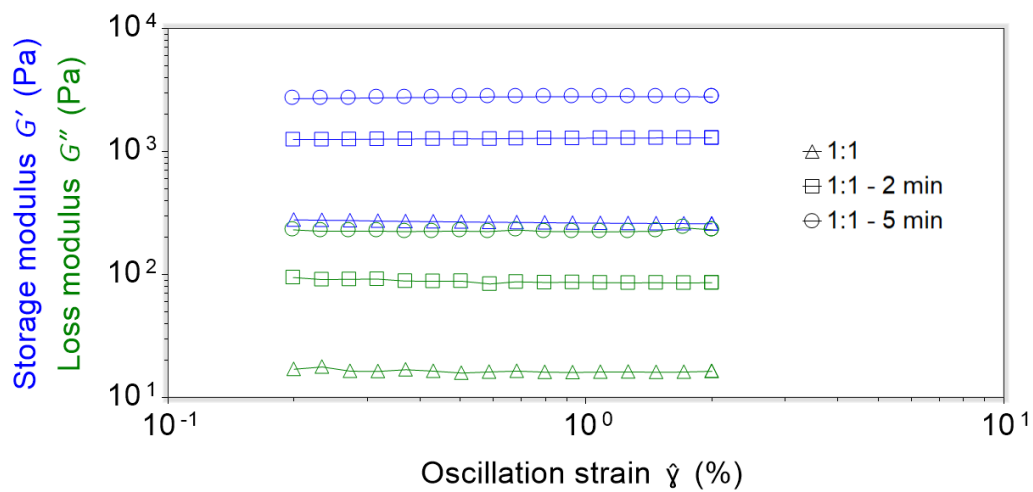


Figura 2.5-2. Barridos de amplitud para valoración de la rigidez de los hidrogeles de tinta 1:1 a distintos tiempos de reticulación.

Tabla 2.5-1. Valores de G' y G'' al 1% de deformación (oscilación).

	G' [Pa]	G'' [Pa]
Sin reticulación	262,81	16,00
2 min	1283,44	85,50
5 min	2794,90	223,38

Tras este análisis de los resultados se seleccionó un tiempo de reticulación equivalente a dos minutos para postprocesar las matrices a imprimir, pues los valores de rigidez (propios de un tejido medio-blando) podían resultar adecuados para el estudio celular a realizar y también ser suficientes para garantizar la durabilidad de las matrices en las condiciones de cultivo.

2.6. Proceso de impresión de las matrices tridimensionales

2.6.1. Selección y configuración del modelo 3D para la fabricación de las matrices tridimensionales

En este capítulo se trabajó con un diseño CAD con forma de disco, que fue creado en formato STL con SolidWorks. El diseño, se ajustó a las dimensiones de las placas de cultivo que iban a servir de soporte de impresión, seleccionando un diámetro final de 15 mm. Se eligieron placas esterilizadas de 35 mm (μ -Dish 35 mm, low wall, ibiTreat; ibidi GmbH)¹⁹² como soportes de impresión pues permitían un fácil manejo y un análisis microscópico directo, aseguraban la esterilidad y dificultaban la evaporación del medio al cerrar de forma completa la tapa. En cuanto a la altura de la pieza a imprimir, se fijó en 0,45 mm para facilitar su observación mediante microscopio, pues de ser demasiado gruesa podía entorpecerse el paso de la luz y dificultar las tareas de caracterización.

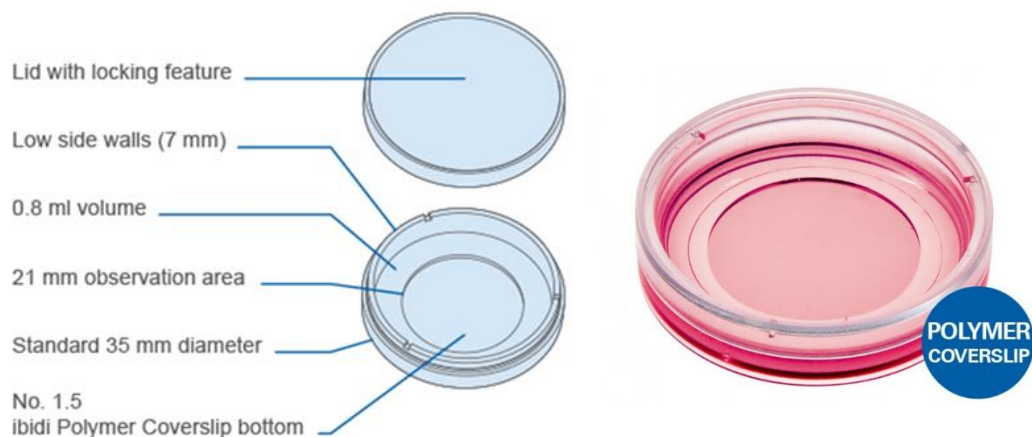


Figura 2.6-1. Detalle de las placas ibidi® seleccionadas como soportes de impresión para la fabricación de las matrices. Extraído de (Ibidi GmbH, 2021).

Para la siembra preliminar de células en la tinta de biomaterial seleccionada, se idearon dos configuraciones de un mismo modelo 3D que, además de permitir valorar la no-toxicidad de la tinta para las células, también permitiera visualizar la interacción de estas

con la misma. Se empleó el software de corte de código abierto Slic3r para convertir archivos de formato STL a archivos de extensión .gcode, el formato legible por impresora. El primer modelo configurado (modelo A) era una malla tradicional con los trazos depositados formando un ángulo de 90 grados con la siguiente capa, es decir, un andamio o *scaffold* común con la misma porosidad en cada capa. El modelo B, en cambio, se configuró para ser impreso con una capa sólida inferior (con 100% de densidad de relleno) seguida de capas de malla a 90 grados en la parte superior. La configuración de este segundo modelo generaba matriz de pocillos con una base de hidrogel.

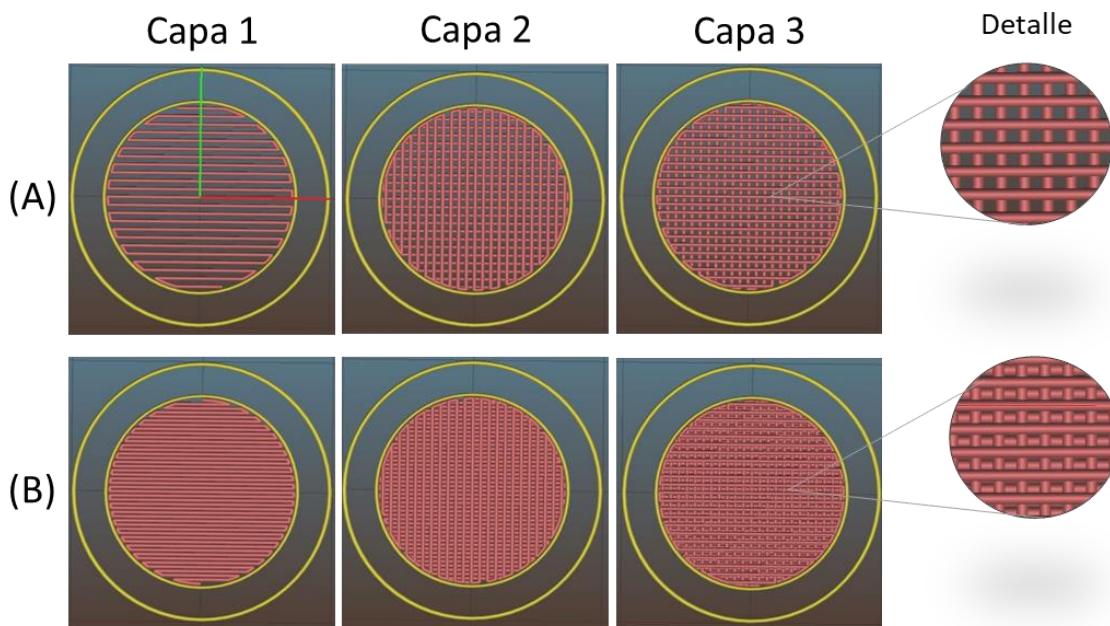


Figura 2.6-2. Previsualización en Slic3r de la estructura de los modelos y detalle de su porosidad.

Mediante Slic3r se ajustaron los distintos parámetros de impresión, que dieron lugar a una configuración y ejecución concreta de la pieza. Todos los parámetros de impresión se mantuvieron iguales para la ejecución de los distintos modelos, excepto el número de capas sólidas inferiores (Tabla 2.6-1). En este tipo de modelos es importante no configurar ninguna capa sólida superior para que la malla quede abierta y se puedan sembrar células sobre los pocillos generados y/u observar el comportamiento de estas en el caso de embeberlas en el hidrogel antes de imprimirlas. Se utilizaron puntas dispensadoras de extremo romo de acero inoxidable con 0,25 mm de diámetro interior (25G) como boquillas de impresora.

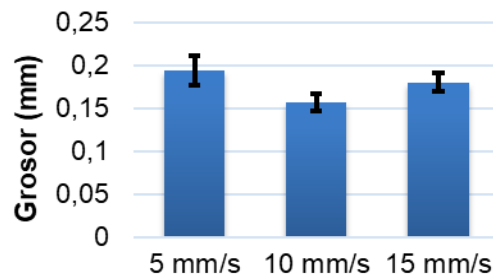
Tabla 2.6-1. Parámetros de impresión empleados en los modelos 3D para cultivo celular.

Modelo 3D	A	B
Velocidad primera capa	95%	95%
Diámetro de boquilla	0,25 mm	0,25 mm
Ángulo de relleno	90°	90°
Densidad de relleno	60%	60%
Patrón de relleno	Rectilíneo	Rectilíneo
Perímetros	1	1
Capas sólidas superiores	0	0
Capas sólidas inferiores	0	1
Altura primera capa	0,15 mm	0,15 mm
Altura de capa	0,15 mm	0,15 mm
Tiempo de impresión aproximado	2 min 30s	2 min 30s

Para seleccionar la velocidad de impresión más adecuada, se llevó a cabo una prueba de impresión sencilla basada en extruir líneas rectas con la tinta seleccionada a diferentes velocidades y medir el grosor del trazo. La Tabla 2.6-2 recopila los resultados de los ensayos, que se realizaron por triplicado a cada velocidad. Se estableció una velocidad de 10 mm/s por la mayor definición en las líneas con menor desviación.

Tabla 2.6-2. Grosor de trazo (mm) a distintas velocidades para la tinta 1:1.

Grosor (mm)	5 mm/s	10 mm/s	15 mm/s
Test 1	0,192	0,148	0,183
Test 2	0,211	0,156	0,189
Test 3	0,177	0,168	0,168
Promedio	0,193	0,157	0,180
SD	0,017	0,010	0,011



2.6.2. Impresión, reticulación y conservación de las muestras

Tras su preparación, las tintas se mantuvieron a 30 °C durante unos 30 min previos a su uso. Para llevar a cabo la impresión de los modelos 3D, la temperatura del extrusor se fijó en 25 °C para asegurar que la tinta se mantuviera lo suficientemente fluida como para ser extruida a través de la boquilla y trazar las trayectorias realizadas por la impresora, mientras que la temperatura de la base de impresión se ajustó a 14 °C para lograr la gelificación in situ del material y obtener piezas con buena definición y resolución.

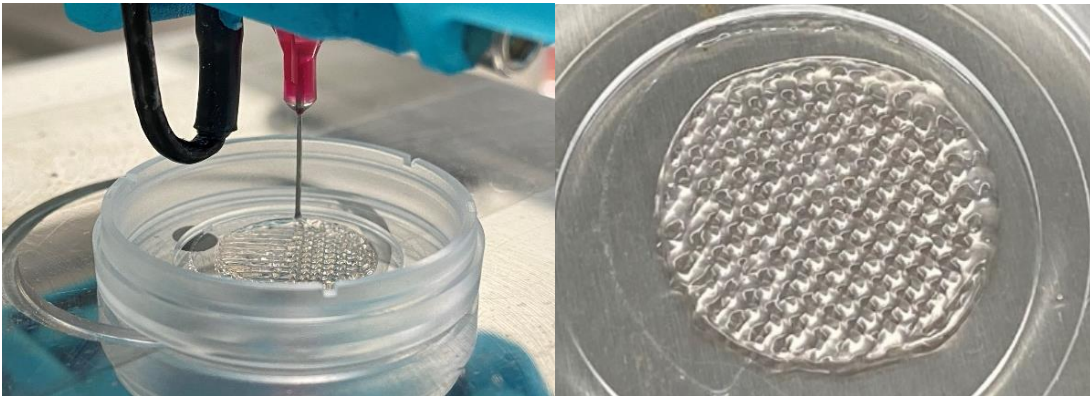


Figura 2.6-3. Imagen fotográfica del proceso de impresión (izda.) y de una figura impresa terminada (dcha.).

Las imágenes extraídas de la visualización estereomicroscópica de los modelos A y B mostraron estructuras uniformes, con trazos y poros regulares en tamaño y forma (Figura 2.6-4). Los resultados fueron repetibles para cada una de las sucesivas piezas impresas en ambas configuraciones de modelo (con y sin capa sólida inferior).

Para asegurar el mantenimiento y la integridad de la estructura obtenida, las piezas se cubrieron con solución de CaCl_2 al 0,5% durante dos minutos de modo que se produjera la reticulación del alginato. Pasado ese tiempo, se lavaron dos veces con PBS y se cubrieron de medio de cultivo específico para el tipo celular. Gracias a las tapas de los soportes de impresión, las muestras se protegieron de los posibles agentes contaminantes y de las pérdidas de humedad durante el proceso de transporte, conservación y cultivo. Todas las muestras fueron debidamente rotuladas e identificadas para llevar a cabo su control y observación de forma correcta por parte del personal de FINBA involucrado en la investigación.

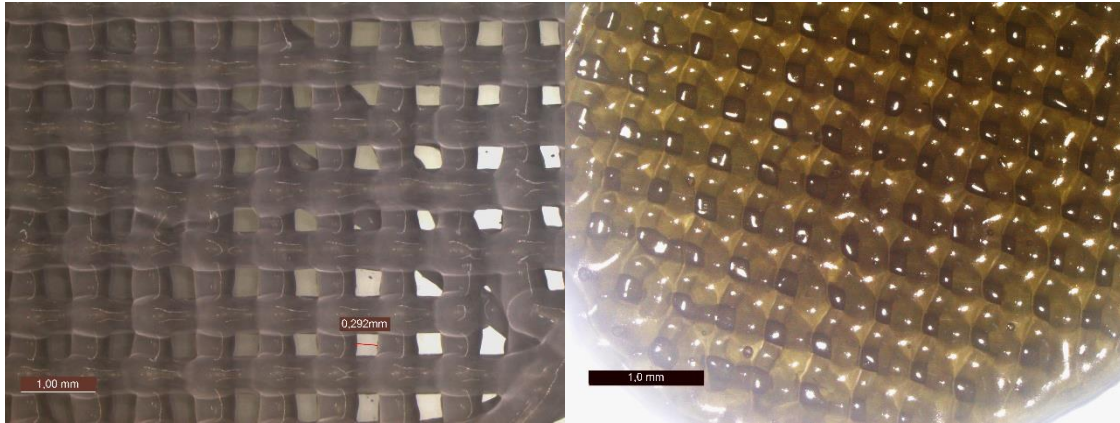


Figura 2.6-4. Imagen estereomicroscópica de los modelos A (izda.) y B (dcha.) impresos. Las barras de escala corresponden a 1 mm.

Cabe hacer especial mención a que la consecución de modelos tridimensionales a partir de un hidrogel —logrando un tamaño de poro tan pequeño y una alta resolución— fue una combinación de procesos de reticulación físicos y químicos. Como se ha mencionado anteriormente, la gelatina jugaba un papel importante en la impresión porque su rápida gelificación al contacto con la superficie fría de la plataforma daba como resultado estructuras regulares con una buena definición de malla. Sin embargo, si no se hubieran incluido el alginato de sodio y colágeno en la composición, este efecto se hubiera visto revertido cuando las estructuras se incubasen a 37 °C. Por un lado, la reticulación del alginato produjo una gelificación iónica, evitando el colapso de la estructura y aportándole propiedades mecánicas. Por otro lado, la polimerización del colágeno en condiciones normales de cultivo (37 °C y pH neutro ~7,4) también contribuyó a mejorar la estructura interna del hidrogel y su resistencia mecánica.

2.7. Viabilidad y proliferación de células tumorales sembradas en andamios impresos

2.7.1. Materiales y métodos

Para determinar si las células tumorales eran viables y conservaban su capacidad de proliferar en presencia de las tintas de biomaterial formuladas, se imprimieron los modelos A y B de matriz y se emplearon para el cultivo de células, depositándolas en forma de suspensión directamente sobre las estructuras.

Se emplearon dos tipos celulares: la línea 786-O, células de carcinoma renal, y la línea SCC38, células de carcinoma escamoso o epidermoide de laringe. Se sembraron unas matrices con 5×10^4 células SCC38 y otras con 2.5×10^4 células 786-O, y se incubaron en condiciones normales de cultivo celular durante 96 h. Los trabajos de siembra y cultivo fueron realizados por el personal de FINBA en sus instalaciones.

2.7.2. Resultados

Tal y como puede verse en la Figura 2.7-1A, en las matrices impresas con el modelo A, ambos tipos celulares se depositaron y crecieron en los poros de la estructura impresa, adhiriéndose a la superficie de la placa Ibidi® (el soporte de impresión) y estableciendo, a su vez, contactos con el hidrogel de alrededor. Las células proliferaron y ocuparon toda la superficie del vidrio después de 48 h de cultivo, mostrando siempre cierto tropismo celular hacia la matriz de hidrogel.

Sin embargo, se observó un comportamiento celular diferente cuando las células se cultivaron en estructuras con una capa sólida inferior (modelo B). En este caso, no crecieron como una monocapa, sino que se autoensamblaron formando esferoides multicelulares 3D (MCS, del inglés *multicellular spheroid*). Las células SCC38 formaron

MCS de mayor tamaño y de forma regular, mientras que los ensamblados con células 786-O eran más amorfos y mostraban menos cohesión entre las células (Figura 2.7-1B).

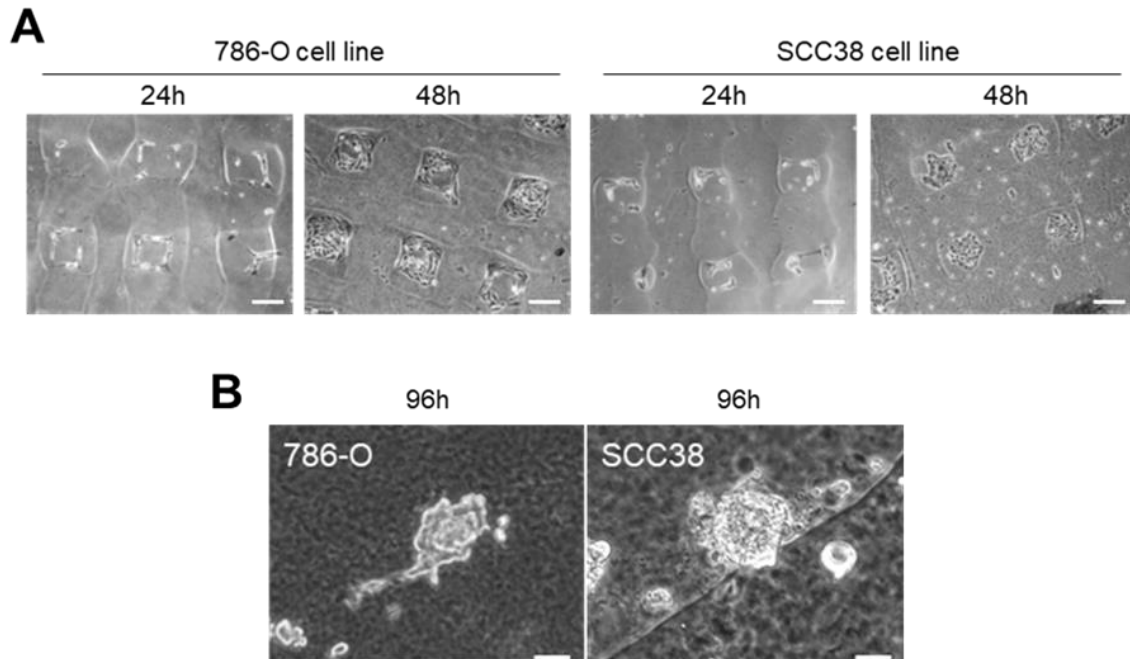


Figura 2.7-1. (A) Células sembradas sobre hidrogelos impresos usando el modelo A. Escala: 500 μm . (B) Imágenes representativas de los esferoides multicelulares autoensamblados a las 96 h de incubación sobre el modelo B de estructura. Escala 50 μm . Imágenes cedidas por FINBA.

La apreciación en detalle de los esferoides (Figura 2.7-1B) también permitió valorar el grado de polimerización del colágeno, que depende de las condiciones de temperatura y puede determinarse empíricamente con un microscopio de contraste de fase estándar. Así, por ejemplo, las soluciones incubadas a 16 $^{\circ}\text{C}$ pueden mostrar grados variables de fibras densas mientras que en geles incubados a 37 $^{\circ}\text{C}$ las fibras no son observables.¹⁶²

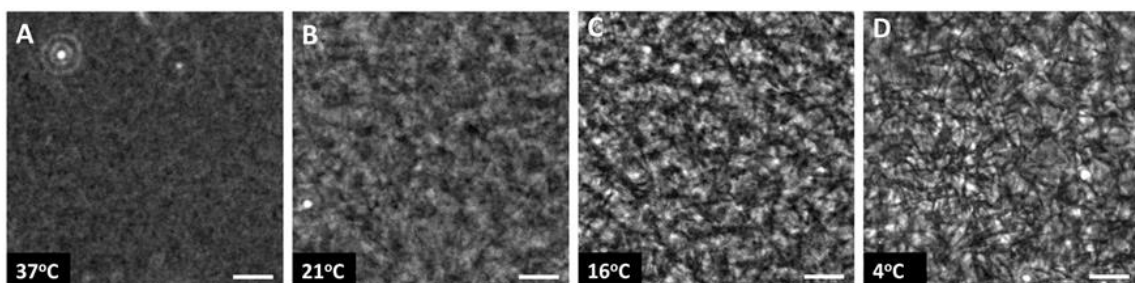


Figura 2.7-2. Diferencias observables en la arquitectura de un gel de colágeno polimerizado a 37 $^{\circ}\text{C}$ (A), 21 $^{\circ}\text{C}$ (B), 16 $^{\circ}\text{C}$ (C) y 4 $^{\circ}\text{C}$ (D). Extraído y adaptado de (Doyle, 2016).

Al comparar las imágenes de los esferoides en la estructura impresa (Figura 2.7-1B) con el aspecto de los geles de colágeno de la Figura 2.7-2, se distingue un hidrogel con aspecto intermedio entre los geles obtenidos a 37 °C y a 21 °C en cuanto a la presencia de fibras. Este tipo de matriz detectado es acorde al proceso de polimerización del colágeno que se da en las tintas, derivado del propio protocolo de formulación en el que se mantiene la biotinta a 30 °C durante al menos 30 min tras la mezcla de la parte A y B. La polimerización del colágeno se completa al someter las estructuras impresas a las condiciones de cultivo comunes, a 37 °C.

La realización de estos primeros ensayos permite concluir, por tanto, que las tintas biomateriales formuladas son adecuadas para la bioimpresión de células tumorales, al no verse afectada la viabilidad ni el crecimiento celular y que, además, parecen imitar apropiadamente el papel de la matriz extracelular, permitiendo tanto la adherencia como la proliferación celular y el ensamblaje de esferoides multicelulares.

2.8. Viabilidad y proliferación de células tumorales bioimpresas

2.8.1. Materiales y métodos

Con el propósito de estudiar la viabilidad y el comportamiento de las células tumorales al ser incluidas dentro de la tinta biomaterial y posteriormente bioimpresas, se formularon distintos lotes de biotintas con una parte A cargada siempre con el mismo número aproximado de células (2×10^6 células 786-O), combinada a partes iguales con la parte B. Una vez mezcladas ambas partes hasta su homogeneización, las biotintas se mantuvieron en un baño a 30 ± 2 °C hasta el momento de la impresión.

Para lograr distinguir mejor las células dentro de los hidrogeles, el personal investigador de FINBA generó una población estable de células 786-O capaz de expresar la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés, *green fluorescent protein*), que fueron bioimpresas y observadas en el microscopio de fluorescencia. Paralelamente, para realizar el ensayo de viabilidad, células 786-O sin GFP se incubaron durante 15 días una vez impresas y posteriormente se tiñeron con el kit comercial Live/Dead viability/cytotoxicity (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se seleccionó el modelo B como diseño 3D para este ensayo porque permitía una mejor observación directa de las células en los diferentes tipos de capa, pues contaba con una capa de tipo sólido en la base y una malla superpuesta a continuación. Después de la impresión, las estructuras se reticularon con una solución de CaCl_2 al 0,5% (p/v) durante 2 minutos y se lavaron posteriormente con PBS para eliminar los posibles restos de solución. Finalmente, se añadió como medio de cultivo una mezcla de DMEM con un 10% de suero bovino fetal bovino, penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 $\mu\text{g/mL}$).

Las matrices fueron bioimpresas, reticuladas y acondicionadas en IDONIAL para su posterior mantenimiento en condiciones normales de cultivo. Inmediatamente después de su preparación, se trasladaron a las instalaciones de FINBA para realizar las tareas de observación, cuantificación y análisis necesarias.

2.8.2. Resultados

La microscopía de campo claro permitió la primera visualización de las células 786-O introducidas dentro de las estructuras, por las cuales se dispersaron de forma mayoritariamente individual. La Figura 2.8-1 muestra una de las mallas recién impresas (Día 0) donde se pueden apreciar las células individuales como cuerpos esféricos y brillantes a lo largo y alto de la matriz hidrogel. Con el transcurso de los días, el número de células incrementó notablemente y se identificaron algunas agrupaciones de células derivadas del crecimiento y división de aquellas que anteriormente estaban aisladas. El número de células se duplicó después de aproximadamente 15 días de cultivo, indicando que las células bioimpresas proliferan con una tasa más baja que las células no bioimpresas y asemejándose más al comportamiento de las células cancerosas nativas, pues la mayoría de los tumores tardan entre tres y seis meses en duplicar su tamaño.¹⁹³

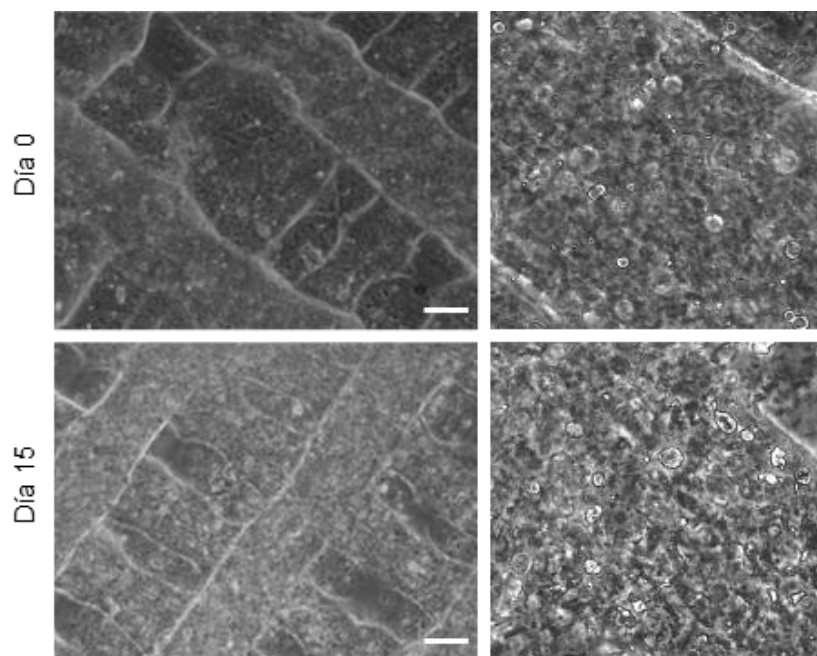


Figura 2.8-1. Imagen en campo claro de estructura bioimpresa donde se pueden observar las células 786-O. La barra de escala equivale a 500 μm . Imágenes cedidas por FINBA.

Posteriormente, se procedió a la observación de matrices con células que expresaban la proteína GFP. Esta proteína, procedente de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*, provee una herramienta útil para la biología celular al tener la propiedad de emitir bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible al ser excitada con luz UV. Las células se incorporaron a la tinta biomaterial siguiendo el protocolo de formulación

anteriormente indicado (sección 2.3.2) y se imprimieron empleando el mismo modelo B. Las imágenes extraídas del microscopio de fluorescencia y de campo claro de la misma región de la malla mostraron células individuales que podían visualizarse dentro o fuera de foco, indicando así sus diferentes posiciones en el plano Z dentro del hidrogel (Figura 2.8-2).

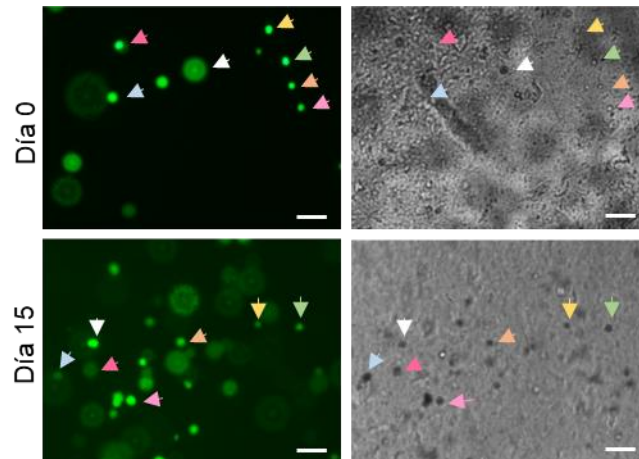


Figura 2.8-2. Imágenes microscópicas de fluorescencia y de campo claro de las células 786-O que expresan la proteína GFP (flechas) -algunas de ellas desenfocadas debido a su ubicación en diferentes posiciones z-. La barra de escala equivale a 100 μm . Imágenes cedidas por FINBA.

Finalmente, se analizó la viabilidad celular usando calceína y bromuro de etidio para teñir células vivas (verde) o muertas (rojas) en células que no expresaban GFP. Aproximadamente el 90% de las células bioimpresas permanecieron viables (verde) después de 15 días de cultivo (Figura 2.8-3).

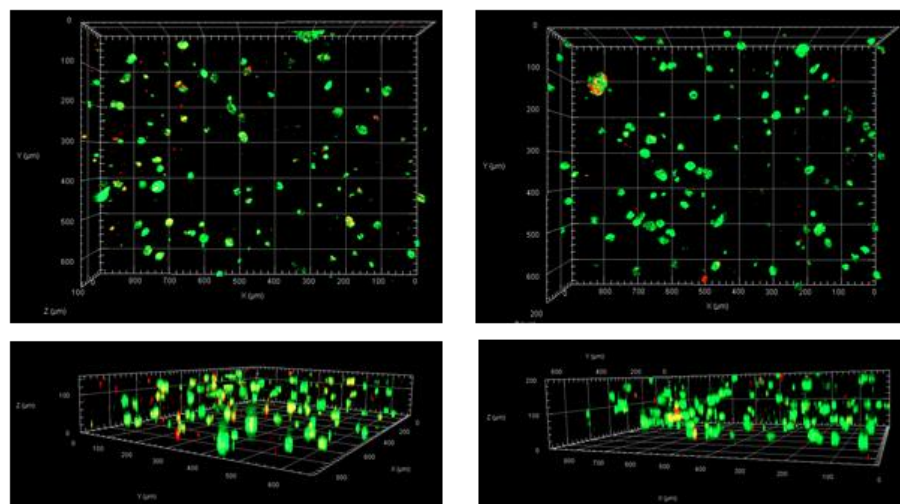


Figura 2.8-3. Proyecciones XY (imágenes superiores) y XZ (imágenes inferiores) de las estructuras tridimensionales con las células teñidas para el análisis de la viabilidad celular. Imágenes cedidas por FINBA.

Además de mantenerse vivas, las células bioimpresas retuvieron los movimientos intracelulares de los componentes del citoplasma, una propiedad intrínseca de las células vital para regular los eventos fisiológicos relevantes. Más importante aún, se detectó que estas células tumorales eran capaces de construir proyecciones celulares similares a TNT (del inglés, *tunneling nanotube*) dentro del hidrogel, estructuras identificadas principalmente en cultivos 2D y cuya presencia en cultivos 3D ha sido objeto de controversia hasta la fecha. Los TNT son tubos delgados de membrana que conectan células distantes y funcionan como canales para el transporte intercelular de cargas diversas, incluidos orgánulos celulares como las mitocondrias.¹⁹⁴ La aparición de esta comunicación intercelular en los modelos bioimpresos desarrollados en el presente capítulo proporciona una nueva herramienta alternativa para estudiar la relevancia funcional de dichas estructuras similares a TNTs en la tumorigénesis y la susceptibilidad a los fármacos contra el cáncer en un microambiente tumoral altamente controlado y reproducible. En esa línea, el artículo publicado a raíz de este capítulo y la tesis de la doctoranda Lucía Celada recopilan y profundizan la información asociada a este hallazgo y los trabajos específicos que dan continuidad a esta investigación.^{195,196}

2.9. Valoración del capítulo

En este capítulo se describe la generación de unas matrices bioimpresas creadas con el propósito de ser empleadas como modelos para el cultivo y estudio de células tumorales en un entorno tridimensional. Las fórmulas se han preparado teniendo en cuenta las cualidades básicas de un cultivo celular y, a su vez, los requerimientos del proceso de impresión en cuanto a las características de imprimibilidad de los materiales. De ese modo, se ha combinado un hidrogel optimizado de colágeno, alginato sódico y gelatina con un medio de cultivo celular líquido convencional gracias al cual, si la investigación lo requiere, las cargas celulares pueden ser introducidas dentro de la tinta biomaterial generándoles el mínimo estrés posible. Además de tratarse de formulaciones de preparación relativamente sencilla y rápida empleando utillaje básico de laboratorio, se han utilizado materiales cotidianos para cualquier investigador en el campo y asequibles desde un punto de visto económico, motivos que hacen que estas tintas sean totalmente accesibles a cualquier personal técnico que quiera aplicar o trasladar estos trabajos a su investigación.

Las matrices han sido impresas usando el equipo de extrusión de semisólidos BIDO-I, cuyo sistema de control de temperaturas de impresión ha permitido regular térmicamente la viscosidad de la tinta, logrando una deposición controlada y generando estructuras de dimensiones reducidas con una alta resolución y, sobre todo, una impecable reproducibilidad. La obtención de estos resultados se ha conseguido gracias también al exhaustivo examen reológico y de imprimibilidad realizado a las diferentes fórmulas para lograr comprender cuál de las combinaciones de materiales resulta adecuada y encaja con el perfil de fluido que la tecnología de impresión exige (pseudoplasticidad, viscoelasticidad...), cómo de rápida es la recuperación de la viscosidad de la tinta o a qué velocidad de impresión se logra una mejor deposición. Además, se ha conseguido una reticulación suficiente de las estructuras impresas mediante un mecanismo inocuo para las células: el uso de cloruro de calcio a una concentración relativamente baja y asegurando la eliminación de la solución residual mediante el lavado de las mallas con PBS. Se evita así el uso de materiales fotopolimerizables y los posibles efectos nocivos derivados de la

exposición de las matrices bioimpresas a radiación ultravioleta o a longitudes de onda que puedan comprometer la viabilidad celular y/o alterar su comportamiento.

Con todo este trabajo, se han logrado obtener unas matrices con diseños diferentes sobre las cuales es posible observar y documentar el comportamiento celular, desde su morfología hasta su organización o la interacción con el hidrogel que conforma la estructura. Los primeros ensayos de siembra han servido para seleccionar un modelo concreto para el resto de los experimentos, en los que se ha profundizado en analizar la viabilidad celular y en observar la disposición de las células a lo largo y profundo de la estructura. Así, se ha descubierto cómo se reparten por el hidrogel, su alta tasa de supervivencia al proceso de impresión y su proliferación a un ritmo más parecido a un tejido real que al obtenido en un cultivo 2D (que es mucho más rápido, pero menos fisiológico). El estudio prolongado de las matrices, que se han conservado intactas en condiciones de cultivo hasta 31 días y con las células totalmente viables, ha permitido la detección de una comunicación intercelular parecida a los TNTs, no documentada con anterioridad para el tipo celular estudiado. La identificación y el análisis funcional de TNTs en contextos complejos, como tejidos tumorales o esferoides multicelulares, es todavía un desafío debido a la ausencia de biomarcadores específicos y a la alta densidad celular de estos modelos de estudio. Por este motivo, este trabajo no es más que el primer paso del nuevo camino abierto gracias al potencial de la bioimpresión de modelos 3D para cultivo celular, que logren generar microambientes fisiológicamente relevantes, que permitan un mejor estudio y una mejor comprensión de la comunicación de las células tumorales, del cáncer y de su tratamiento.

2.10. Conclusiones

- Los hidrogeles de alginato, colágeno y gelatina, en correcta combinación con ingredientes típicos de un medio de cultivo, pueden dar lugar a tintas biomateriales aptas para ser impresas mediante extrusión de semisólidos.
- La bioimpresión permite la obtención de matrices tridimensionales con alta precisión y repetitividad, características necesarias para lograr la generación de un posible modelo tumoral sólido y reproducible.
- Las características estructurales del modelo 3D impreso (porosidad, capas sólidas) tienen una influencia clara en la morfología y el comportamiento de las células sembradas.
- Las células tumorales sembradas o bioimpresas se mantienen viables y fisiológicamente activas durante largos periodos de tiempo en las matrices, posibilitando la observación de un tipo de comunicación intercelular similar a TNTs, no descrito con anterioridad en este tipo de células de cáncer renal (786-O).

Capítulo 3.
Tintas biomateriales para regeneración
ósea

3.1. Introducción y motivaciones

Debido a los cambios en el estilo de vida y al envejecimiento de la población, las lesiones traumáticas óseas y las fracturas inducidas por enfermedades como la osteoporosis constituyen un enorme desafío médico y socioeconómico. Se estima que en todo el mundo una de cada tres mujeres y uno de cada cinco hombres mayores de 50 años sufrirán una fractura ósea osteoporótica.^{197,198} Además, existen otros casos en los que la regeneración ósea puede verse alterada como, por ejemplo, en grandes traumatismos con infecciones subyacentes derivadas de accidentes automovilísticos.¹⁹⁹

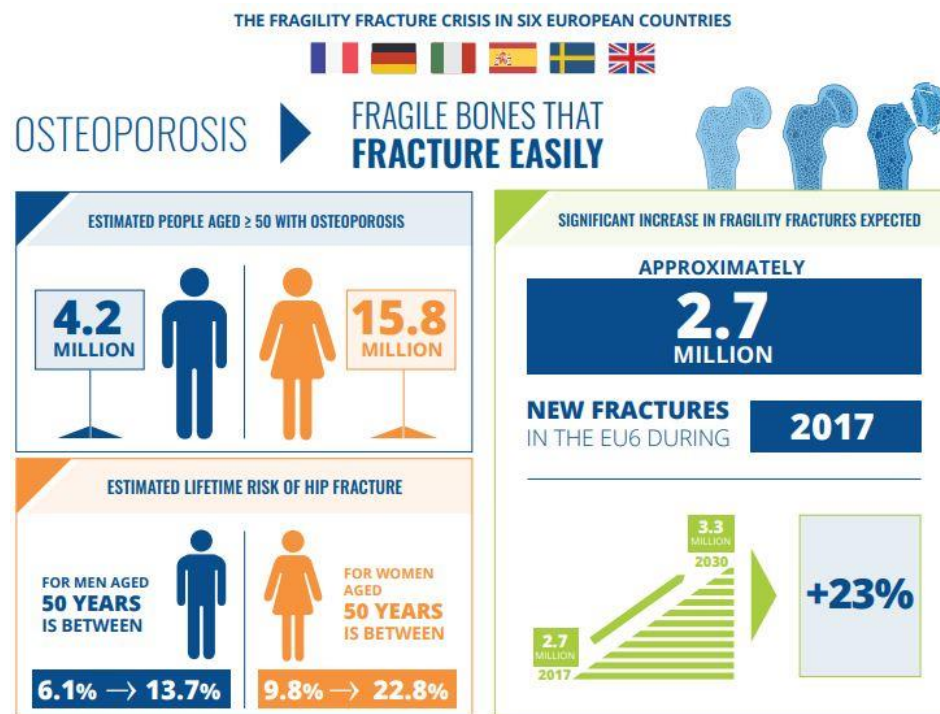


Figura 3.1-1. Infografía sobre la prevalencia de la osteoporosis estudiada en seis países europeos. Extraído de (International Osteoporosis Foundation, 2020).

Dado que la reparación de defectos óseos de gran tamaño y forma compleja sigue siendo un desafío importante, la impresión 3D de injertos óseos biomateriales bajo demanda ha surgido como una alternativa a los autoinjertos y a otras terapias de vanguardia.²⁰⁰⁻²⁰² Como reemplazo a los autoinjertos, el uso de biomateriales tiene el beneficio adicional de

eliminar la necesidad de la extracción invasiva de hueso autólogo, que puede provocar morbilidad en el lugar donante.²⁰³ Además, los injertos óseos impresos en 3D brindan la capacidad de controlar la forma, el tamaño, la morfología de la superficie y la porosidad interna del producto final, permitiendo generar soluciones totalmente personalizadas para traumatismos óseos con difícil autorreparación.

Siguiendo esa línea, un equipo de trabajo multidisciplinar dio lugar al proyecto *3D Printed-Matrix Assisted Chemically Modified RNAs Bone Regenerative Therapy for Trauma and Osteoporotic Patients* (cmRNAbone), presentado y aceptado dentro del programa europeo Horizon 2020 y en el que Fundación IDONIAL participa como socio. El proyecto tiene como objetivo crear un nuevo enfoque terapéutico basado en la combinación de vectores de ARN modificados químicamente (cmRNA) que, una vez incluidos en una tinta biomaterial, darán lugar a implantes específicos para cada paciente que potencien la regeneración ósea. Para lograr este objetivo, a lo largo de los 48 meses de duración del proyecto, se sintetizarán diferentes cmRNA dirigidos a la neurogénesis, angiogénesis y osteogénesis, y se desarrollarán vectores basados en lípidos y nanocápsulas de polisacáridos que permitan la liberación de este ARN en el lugar de la lesión. Estos vectores se incluirán, a su vez, dentro de una tinta biomaterial con propiedades osteogénicas, mediante la cual se imprimirán los injertos específicos y que serán ensayados *in vitro*.



The cmRNAbone project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 87479.

Figura 3.1-2. Logo del proyecto. Extraído de (cmRNAbone Project, 2020).

Para la fabricación de esta solución regenerativa, además de colaborar en la formulación de las tintas, IDONIAL llevará a cabo el desarrollo de una nueva bioimpresora 3D de extrusión de semisólidos. El propósito del rediseño y la fabricación de un nuevo equipo de impresión es que, junto con la realización de auditorías en las instalaciones de los socios y el apoyo de grupos de expertos clínicos, se consiga garantizar una producción de los

implantes conforme a las estrategias regulatorias y comerciales actuales. De entre todas las tecnologías de bioimpresión disponibles, para este proyecto se ha preservado el empleo de la extrusión de semisólidos (SSE) debido a su capacidad excepcional para adaptarse a una amplia gama de fluidos imprimibles cuyas viscosidades oscilan entre 30 mPa s⁻¹ y poco menos de 6×10⁷ mPa s⁻¹.^{204,205} Además, esta tecnología permite la inclusión y combinación, con relativa facilidad, de los distintos componentes de las tintas (vectores lipídicos y nanocápsulas de polisacáridos cargados con cmRNA, biomateriales osteogénicos, fármacos...).

En lo referente a las tintas, el estado del arte recoge un extenso desarrollo de biotintas cerámicas de tipo semisólido (cócteles biológicos de materiales cerámicos, células o factores de crecimiento, entre otros). Sin embargo, la mayoría de las fórmulas obtenidas únicamente son capaces de imprimir estructuras sencillas, con unos pocos milímetros de altura, debido principalmente a unas características reológicas inadecuadas.^{205,206} Paralelamente, se han obtenido resultados más prometedores en la replicación precisa de segmentos óseos de escala centimétrica con cementos óseos comerciales listos para usar u otras formulaciones generadas a partir de polvo esférico (<30 μm), seleccionados por tener una mejor fluidez que los polvos de forma irregular.^{202,206-210} No obstante, ha sido ampliamente documentado que la arquitectura de la superficie, la geometría y la microporosidad de las partículas cerámicas son esenciales para la osteoconducción (la capacidad de formar hueso nuevo en la superficie de los biomateriales) y, en algunos casos, incluso para la osteoinducción (la inducción de la formación de hueso *de novo* a través de la diferenciación celular en células formadoras de hueso).^{204,211-213}

El hueso es un tejido compuesto de fases orgánicas e inorgánicas. Los componentes orgánicos son principalmente colágeno tipo I (~ 30%) y los componentes inorgánicos son, en su mayoría, fosfatos de calcio (~ 70%). La organización a nanoescala de las fases orgánica e inorgánica es la responsable de producir la resistencia mecánica y durabilidad que caracteriza al hueso.²¹⁴ Por ese motivo, se requiere investigar la formulación de tintas capaces de contener altos porcentajes de partículas cerámicas que proporcionen una osteoinductividad intrínseca y que, además, sean susceptibles de extrusión. Idealmente, un biomaterial apto para la regeneración ósea debe cumplir una serie de criterios específicos: ser biocompatible, ser reemplazado por el hueso huésped a una velocidad que coincida con la formación de hueso nuevo, degradarse en componentes no tóxicos y no provocar una respuesta inmunitaria crónica.²¹⁴ Diferentes hidrogeles fabricados a partir de biomateriales convencionales, como el colágeno o la gelatina, han mostrado potencial

para inducir vascularización y osteogénesis. Sin embargo, este tipo de materiales tienen una elasticidad pobre y muy poca resistencia mecánica.^{215,216} Una alternativa que ha demostrado mejorar las propiedades mecánicas, a la vez que las características osteogénicas, es producir un material compuesto combinando un hidrogel con una cerámica, llegando a mejorar incluso la regeneración ósea en comparación con un injerto de hidrogel de colágeno puro.²¹⁵

En esa línea, en este capítulo se desarrolla una primera aproximación a la generación de biotintas cerámicas empleando partículas de fosfato cálcico bifásico (BCP, del inglés *Biphasic Calcium Phosphate*) sintetizadas por Kuros Biosciences, socio constituyente del consorcio del proyecto. Su producto comercial, MagnetOs™, material con demostrada actividad osteogénica y ostoconductiva, ha sido incluido en un hidrogel formulado específicamente para este tipo de partículas, con el propósito de valorar su influencia en las características reológicas, su imprimibilidad y su potencial como alternativa en la reparación de defectos óseos, además de evaluar la aptitud de los equipos de extrusión de semisólidos de IDONIAL en esta tipología de tintas cementosas que serán utilizadas en el desarrollo del proyecto.

3.2. Objetivos

Los objetivos establecidos para este capítulo fueron los siguientes:

1. **La obtención de una tinta de tipo hidrogel que contenga un elevado porcentaje de fosfato cálcico bifásico (BCP) y que sea imprimible mediante extrusión directa.**

Formular una tinta biomaterial a base de hidrocoloides que contenga partículas cerámicas de gran tamaño (150-500 μm), con microporosidad y forma irregular, en un porcentaje de carga elevado (15-30% p/p) que no ha sido explorado hasta la fecha.

2. **La evaluación del efecto de la concentración y del tamaño de las partículas de BCP en las propiedades reológicas y mecánicas de las tintas.**

Al tratarse de tintas con un elevado porcentaje de partículas sólidas en suspensión, el mantenimiento de la estabilidad del fluido —tanto en reposo como al ser sometido a esfuerzos— es vital para asegurar una distribución uniforme de los componentes en la totalidad de las figuras impresas. De ese modo se evitan problemas derivados de la precipitación o el empaquetamiento de los gránulos de BCP como, por ejemplo, la obturación de las boquillas. Tanto la concentración de partículas sólidas como el tamaño de estas son factores que determinan las propiedades reológicas y mecánicas de las tintas y deben ser evaluadas.

3. **Validar el equipo de impresión en la ejecución de estructuras tridimensionales y evaluar el efecto de los parámetros de impresión en las figuras impresas.**

La resistencia mecánica y la capacidad de regeneración ósea del andamio cerámico impreso en 3D pueden verse condicionadas por su estructura. De ese modo, la configuración de parámetros de impresión como la densidad de relleno o el patrón de relleno, determinarán la geometría de la pieza, el número de poros y su interconectividad, afectando a la rigidez de las figuras impresas en 3D.

3.3. Selección de componentes – formulación de la tinta

Para conseguir imprimir estructuras tridimensionales que puedan servir como futuros injertos óseos, empleando un sólido de gran tamaño de partícula como el BCP mencionado, era preciso generar unas tintas biomateriales con unas características determinadas:

- a) Una composición a base de materiales biocompatibles y con unas propiedades fisicoquímicas que permitan la construcción de estructuras tridimensionales que tengan una rigidez suficiente para una correcta manipulación pero que, a su vez, permitan la reabsorción del injerto y la generación de hueso propio.
- b) Unas propiedades reológicas adecuadas al proceso de impresión 3D, que mantengan las partículas distribuidas en la tinta de forma homogénea antes y después de ser sometida a la extrusión.

3.3.1. Descripción de los materiales seleccionados

La información principal de los componentes seleccionados se detalla a continuación, a excepción de aquella relativa al empleo de la gelatina y el alginato sódico, que ya han sido recogidos en el capítulo anterior (páginas 63-66).

Fosfato cálcico bifásico (BCP)

Las biocerámicas se han aplicado durante mucho tiempo como materiales de injerto óseo debido a su prometedora biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y resistencia mecánica. Las biocerámicas más utilizadas son los fosfatos de calcio, debido a su similitud con la fase mineral del hueso, la hidroxiapatita (HA). La HA es el principal componente mineral del hueso natural —representa aproximadamente el 60% de la masa del tejido óseo— y tiene una excelente osteoconductividad y bioactividad.²¹⁰ Según su composición, los fosfatos de calcio sintéticos que se utilizan actualmente como biomateriales se

clasifican como fosfatos tricálcicos ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), de tipo alfa o beta (α - o β -TCP), y fosfatos de calcio bifásicos (BCP) para las mezclas de HA y TCP. El α -TCP tiene una biocompatibilidad mucho mayor que el β -TCP, sin embargo, también es más soluble, por lo que se degrada más rápidamente *in vivo*. Diferentes proporciones de TCP y HA se pueden combinar para formar BCPs que ofrezcan tasas de reabsorción y biocompatibilidad adecuadas.^{210,211,214}

Para este proyecto, Kuros Biosciences ha proveído dos tipos de gránulos, ambos con partículas de forma irregular y con alta microporosidad, pero con diferente rango de tamaño. Denominados como BCP1 y BCP2, los tamaños comprendían entre los 150-500 μm para BCP1 y entre 150-250 μm para BCP2 (Figura 3.3-1). Debido a sus propiedades físicas (tamaño, irregularidad, densidad, propensión al empaquetamiento...), para la impresión de estos materiales a través de SSE se requería un soporte cuya consistencia era crítica, pues debía ser lo suficientemente fluido para ser extruido y, a la vez, lo suficientemente denso como para mantener las partículas suspendidas y distribuidas de forma homogénea a lo largo de la tinta.

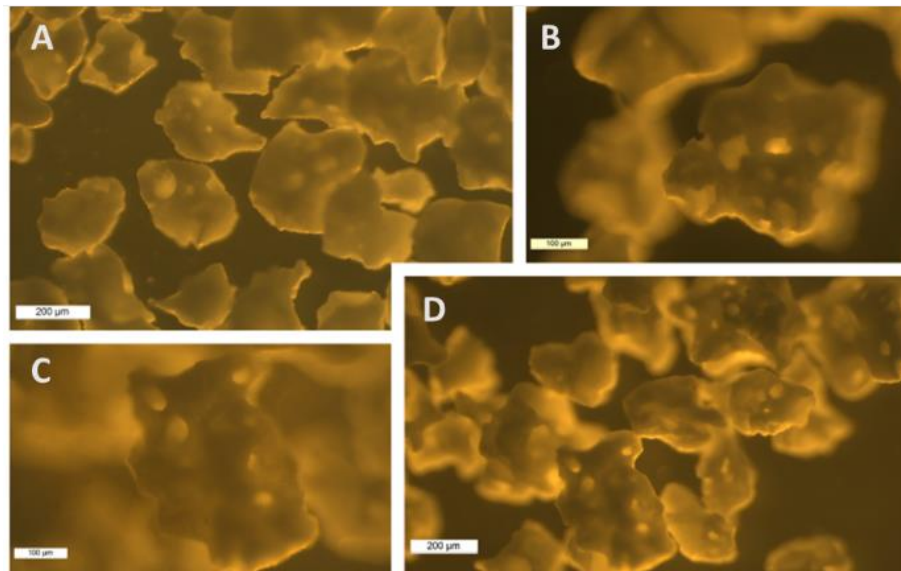


Figura 3.3-1. Imagen estereomicroscópica de los gránulos de BCP2 (A, B) y BCP1 (C, D). Barras de escala: 200 μm (A, D), 100 μm (B, C).

Goma xantana

Es un heteropolisacárido de alto peso molecular segregado extracelularmente por la bacteria *Xanthomonas campestris*. Su estructura está formada por un esqueleto de unidades de D-glucosa unidas entre sí por enlaces $\beta(1-4)$, de forma idéntica a las

celulosas. Una de cada dos glucosas se encuentra unida por un enlace $\alpha(1-3)$ a una cadena lateral formada por dos manosas con un ácido glucurónico entre ellas. La manosa terminal puede tener un grupo piruvato unido, y la manosa más próxima a la cadena central puede tener un grupo acetilo unido a C6 (Figura 3.3-2). En general, aproximadamente una de cada dos ramas tiene un grupo piruvato, pero la proporción de piruvato a acetato varía según la subcepa de *Xanthomonas campestris* utilizada y las condiciones de fermentación. La presencia de grupos piruvato y glucuronato le imparte carácter aniónico por lo que, en el producto comercial, generalmente esos grupos se hallan neutralizados con cationes Na, K y Ca.²¹⁷⁻²¹⁹

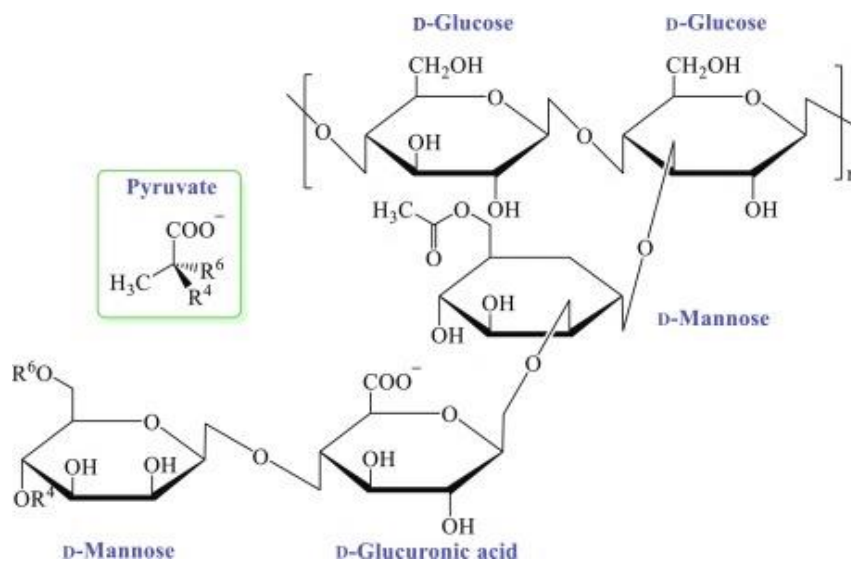


Figura 3.3-2. Estructura de la goma xantana. Extraído de (Nasrollahzadeh et al., 2021).

Las distintas cadenas se unen entre ellas mediante puentes de hidrógeno a través de las ramificaciones laterales. La goma xantana es soluble tanto en agua fría como en agua caliente y su viscosidad depende poco de la temperatura, del pH o de la presencia de concentraciones elevadas de sales. La goma xantana imparte una viscosidad elevada (en reposo) con pequeñas concentraciones del orden del 1%, y presenta además un comportamiento pseudoplástico muy marcado.^{125,167,220}

Aunque la goma xantana es bien conocida por su no toxicidad y su excelente biocompatibilidad,²²¹ su uso aún no se ha explotado por completo para la ingeniería de tejidos y la bioimpresión, con solo unos pocos trabajos reportados en la literatura y ninguno de ellos específicamente para la impresión 3D de materiales osteogénicos.²²²⁻²²⁴

3.3.2. Preparación de las tintas

Se diseñó un sistema coloidal biocompatible con el propósito de cargar gránulos de BCP y controlar las propiedades reológicas para asegurar una buena imprimibilidad. La selección de los materiales fue acorde a las necesidades de formulación en términos de termorreversibilidad, alta afinidad por el agua, comportamiento pseudoplástico con alta viscosidad en reposo y estabilidad bajo el cizallamiento generado durante el proceso de impresión. En esa línea, se generaron cuatro tintas biomateriales mezclando un mismo hidrogel a base de goma xantana, alginato de sodio y gelatina con partículas de BCP de dos tamaños (identificados como BCP1 y BCP2) a dos concentraciones diferentes (Tabla 3.3-1).

Tabla 3.3-1. Composición de las tintas biomateriales de BCP.

	% (p/p)			
	30BCP1	15BCP1	30BCP2	15BCP2
Goma xantana	3	3	3	3
Alginato sódico	2	2	2	2
Gelatina tipo A	2	2	2	2
BCP1 (150-500 μm)	30	15	-	-
BCP2 (150-250 μm)	-	-	30	15
Agua desionizada	63	78	63	78

Protocolo de formulación

Para la preparación de los hidrogeles, en primer lugar, se hidrata la gelatina con una cantidad agua desionizada equivalente a aproximadamente seis veces su peso en agua, para asegurar una correcta hidratación, y se funde en un baño a 40 ± 2 °C. Mientras tanto, se mezclan manualmente las cantidades requeridas de polvo de goma xantana y alginato sódico en otro recipiente y se le añade la mitad del agua restante, de forma gradual, hasta formar una pasta homogénea. En este punto, se incorpora lentamente gelatina fundida y se mezcla suavemente. Finalmente, se agregan al hidrogel obtenido los gránulos de fosfato cálcico bifásico del tipo correspondiente —humectados con la última porción de agua desionizada para facilitar su manipulación—, y a la concentración en peso necesaria para obtener la tinta biomaterial final.

Durante todo el proceso de formulación se realiza una agitación manual de los componentes para evitar la incorporación de aire a la tinta. Las fórmulas se dejan reposar en un baño a 60 ± 2 °C durante unos 15 min. Durante este tiempo, para evitar la pérdida de agua, es conveniente envolver los recipientes con Parafilm. Finalmente, mientras las tintas permanecen calientes, se llenan las jeringuillas de 3 ml compatibles con la impresora 3D y se almacenaron refrigeradas a 4 °C hasta su uso.

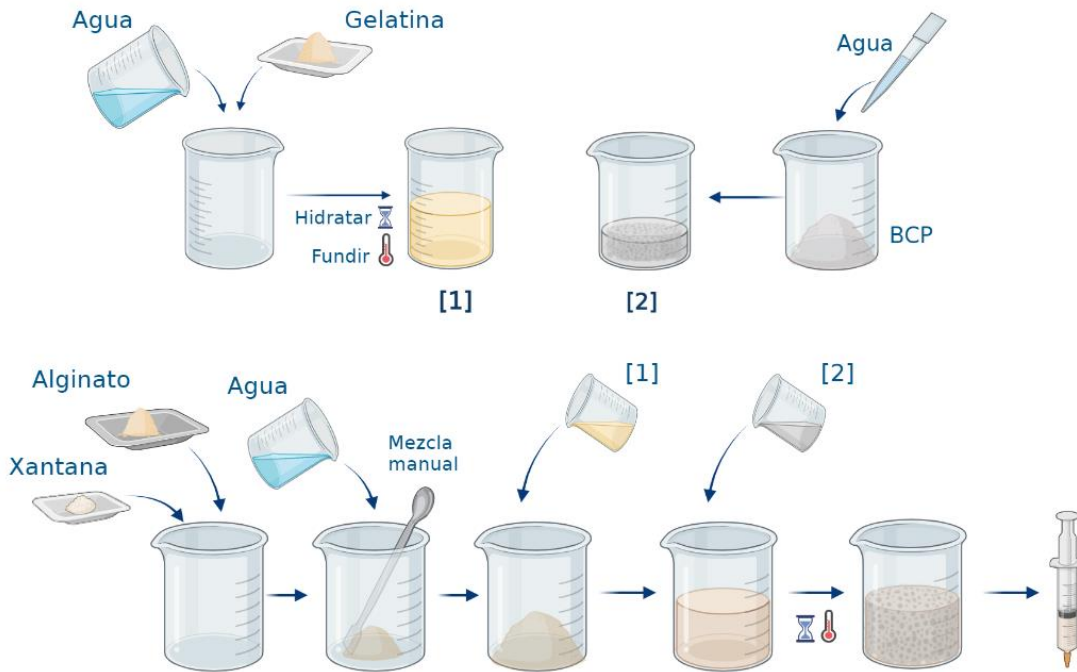


Figura 3.3-3. Esquema del protocolo de formulación de las tintas de BCP.

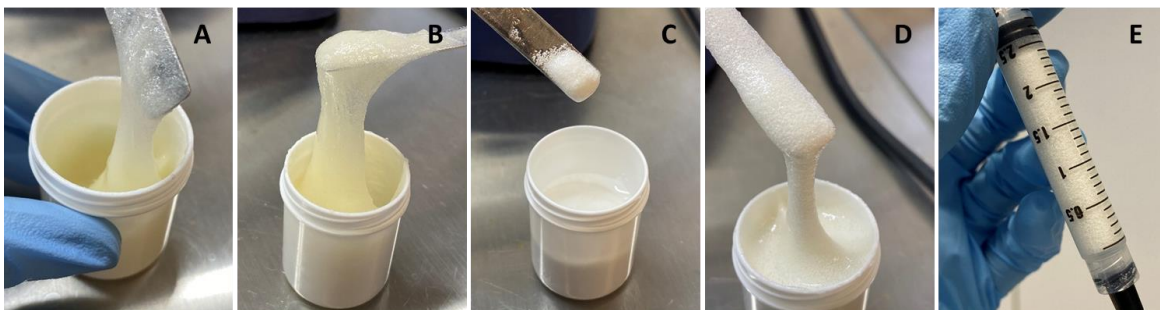


Figura 3.3-4. Aspecto de las mezclas en las diferentes etapas de formulación de las tintas de BCP.

3.4. Análisis reológico

3.4.1. Materiales y métodos

Para la caracterización reológica de las tintas de fosfato cálcico bifásico, las mezclas se calentaron en un baño a 30 °C durante 30 min antes de las pruebas, de modo que tuvieran una mayor fluidez y pudieran ser manipularlas sin dañar la estructura interna del gel. Se emplearon 1,5 ml aproximadamente de tinta para cada ensayo y se depositaron mediante espátula en el plato del reómetro. Todos los ensayos estuvieron precedidos de un tiempo de equilibrado previo para asegurar la relajación estructural de la muestra.

Las curvas de flujo se realizaron aumentando la velocidad de corte de forma constante desde 0,01 hasta 100 s⁻¹ en 120 s a 37 °C. Posteriormente, los datos del reograma se ajustaron a distintos modelos matemáticos para evaluar el comportamiento de las tintas empleando el propio software de visualización de datos del reómetro.

La tixotropía se midió inicialmente mediante un ensayo SFM, aplicando una velocidad de corte de 0,4 s⁻¹ durante 120 s en la primera y en la última etapa, mientras que en la etapa central se aplicó una velocidad de cizallamiento de 100 s⁻¹ durante 40 s. La regeneración estructural se determinó como el porcentaje de la viscosidad obtenida después de la aplicación de la segunda etapa, con respecto a la viscosidad media obtenida en los 40 últimos segundos de la primera etapa, donde la viscosidad consigue su valor en equilibrio. Este ensayo se realizó a 37 °C y a temperatura ambiente para valorar la recuperación de la tinta a diferentes franjas de viscosidad. Debido a que las mediciones del ensayo SFM a temperatura ambiente resultaron poco reproducibles, se utilizó un método análogo llamado SDM (del inglés, *Stepped Dynamic Method*) que utiliza etapas de esfuerzo oscilatorio para evaluar adecuadamente la regeneración estructural de una muestra. Para llevarlo a cabo, en primer lugar, se determinó el intervalo viscoelástico lineal (LVR) —y su límite de linealidad (γ_c) —mediante barridos de amplitud en un intervalo de deformación de 0,1 a 100% y a una frecuencia fija de 1 Hz, lo cual permitió evaluar su comportamiento viscoelástico. Las pruebas de SDM se realizaron midiendo viscosidad compleja (η^*) a

deformación baja (0,1%), a deformación alta (del 20%, fuera del LVR de las tintas para destruir la estructura interna de las muestras) y nuevamente a una deformación baja. La recuperación de viscosidad compleja se determinó como el porcentaje de viscosidad obtenido durante los primeros 30 s y los 60 s en el tercer paso (después de una alta deformación), en relación a la viscosidad promedio obtenida en los últimos 30 s del primer paso.

3.4.2. Resultados

3.4.2.1. Curvas de flujo

La carga de partículas es uno de los factores que afectan la reología de las dispersiones y suspensiones. El modelo de Krieger-Dougherty describe la relación entre la viscosidad de una suspensión y su contenido en sólidos:

$$\frac{\eta}{\eta_{med}} = \left(1 - \frac{\phi}{\phi_{max}}\right)^{-[\eta]\phi_{max}}$$

Donde η es la viscosidad del material, η_{med} es la viscosidad del medio, ϕ es la fracción sólida y ϕ_{max} la fracción sólida máxima. La fracción sólida mide el volumen de partículas dividido por el volumen total de la suspensión, y la fracción sólida máxima corresponde al volumen máximo de partículas que se pueden agregar a una suspensión, que depende del tamaño y de la forma de las partículas.^{114,225,226}

Siguiendo este modelo, la viscosidad de la suspensión se verá afectada por ϕ y ϕ_{max} . Por lo tanto, el aumento de la fracción sólida aumenta la viscosidad a medida que las moléculas de empaquetamiento dificultan el flujo. En esa línea, las curvas de flujo (Figura 3.4-1) reflejaron valores de viscosidad más altos para hidrogeles cargados con un 30% en peso de BCP (30BCP1 y 30BCP2). Además, todas las mezclas mostraron una disminución de la viscosidad al aumentar las velocidades de cizallamiento, revelando claras propiedades pseudoplásticas. Este comportamiento es muy conveniente para fluidos que experimentan altas velocidades de cizallamiento, como al pasar a través de una boquilla en el caso de la impresión 3D mediante extrusión de semisólidos.

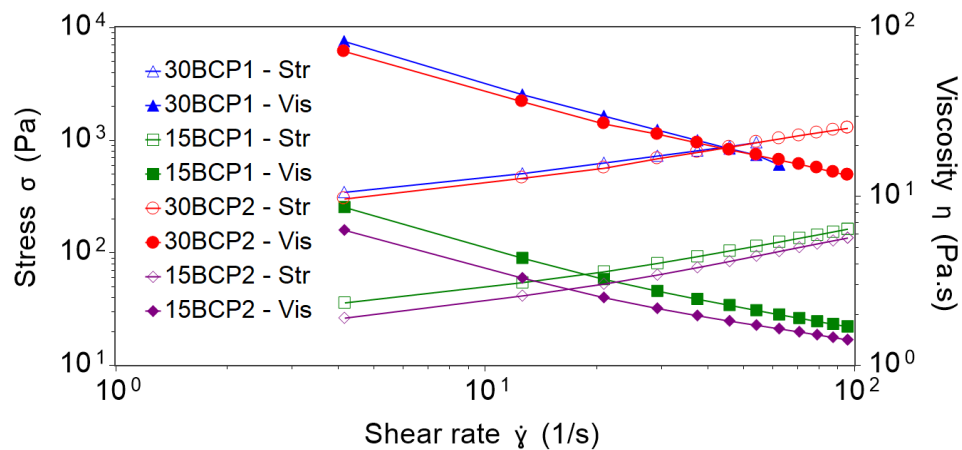


Figura 3.4-1. Reograma de las tintas de BCP a 37 °C.

Los reogramas obtenidos fueron similares para las tintas con la misma concentración de partículas, aunque el tamaño de partículas fuera diferente. Así, los perfiles de 30BCP1 y 30BCP2 prácticamente se superponían, mientras que 15BCP1 y 15BCP2 mostraron una misma tendencia y valores similares. Sin embargo, es relevante mencionar que, a velocidades de cizallamiento altas, el comportamiento de la tinta con mayor concentración y mayor tamaño de partícula (30BCP1) cambió, volviéndose un fluido de carácter dilatante. A partir de los 70 s^{-1} , las partículas empezaron a sufrir un empaquetamiento y el fluido se endureció, desplazándose finalmente fuera de los platos de medición e invalidando las medidas. Por esa razón, 30BCP1 se pudo medir únicamente entre $0,01$ y 70 s^{-1} . No obstante, este efecto no se manifestó en el caso del 30BCP2, dejando patente que existe un impacto del tamaño de partícula sobre la reología de las dispersiones sólidas, aunque los perfiles de viscosidad sean parecidos.

En la Tabla 3.4-1 se muestran los resultados obtenidos del ajuste de los valores experimentales a los tres modelos matemáticos, y los coeficientes de correlación correspondientes. Como se puede apreciar, en este caso tanto el modelo de Herschel-Bulkley como el de Sisko ajustaron los resultados experimentales con valores de R^2 superiores a 0,999 para todas las tintas y sin valores negativos en ninguno de sus coeficientes, siendo así aptos para su interpretación.

Al igual que los perfiles plasmados en el reograma, los valores experimentales de ambos modelos estuvieron fuertemente marcados por la concentración de gránulos en la tinta. Para una misma concentración de partículas, un mayor tamaño de los gránulos implicó un mayor valor de K , indicando un aumento de la viscosidad aparente. En cuanto a τ_0 — parámetro de especial relevancia en el modelo de Herschel-Bulkley, al determinar el

umbral de esfuerzo que debe ser excedido para que el fluido se deforme—, siguió la misma tendencia que K : dependencia de la concentración de BCP y valores superiores en tamaños de partícula mayores indicando, a efectos prácticos, que el inicio de la extrusión requería un esfuerzo de menor magnitud en el caso de las tintas con concentración inferior de BCP. Los valores del índice de flujo (n) para este modelo aumentaron al disminuir la concentración y el tamaño de partícula, indicando que la tinta disminuye ligeramente su carácter pseudoplástico. En cuanto al modelo de Sisko, los valores de n se mantuvieron bastante próximos entre sí, siendo la viscosidad newtoniana a infinita velocidad de cizalla (μ_∞) el parámetro más descriptivo con valores notablemente inferiores para las tintas con menor carga sólida.

Tabla 3.4-1. Ajuste de los valores experimentales a los modelos matemáticos seleccionados.

Modelo	Fórmula	K (Pa·s ^{n})	n	τ_0 (Pa)	μ_∞ (Pa·s)	R ²
Ley de potencia	30BCP1	181,07	0,41	-	-	0,9976
	15BCP1	12,89	0,55	-	-	0,9946
	30BCP2	124,74	0,51	-	-	0,9973
	15BCP2	8,54	0,60	-	-	0,9956
Herschel-Bulkley	30BCP1	93,25	0,54	142,08	-	0,9999
	15BCP1	4,98	0,73	21,92	-	1,0000
	30BCP2	70,38	0,62	125,46	-	0,9993
	15BCP2	3,66	0,77	15,38	-	0,9999
Sisko	30BCP1	211,69	0,30	-	4,75	0,9999
	15BCP1	21,99	0,26	-	0,96	0,9999
	30BCP2	173,64	0,32	-	5,80	0,9991
	15BCP2	15,42	0,26	-	0,89	0,9997

3.4.2.2. Tixotropía y velocidad de recuperación

Las pruebas realizadas a 37 °C revelaron mayores valores de recuperación para tintas con baja concentración de partículas (Figura 3.4-2). Sin embargo, al retirar estas muestras de las placas del reómetro se observó una clara separación de las partículas de BCP y la matriz hidrogel que las contenía. Así, a la citada temperatura, el hidrogel de las tintas al 15% de BCP se encontraba en un estado más líquido y con una estructura interna más débil debido a su mayor contenido en agua y a la termorreversibilidad de la gelatina, de modo que no resultó capaz de mantener los gránulos de BCP incrustados en la matriz una

vez sometida a un esfuerzo de cizallamiento. Por ello, después de la etapa de alta velocidad de corte, las partículas sólidas pasaron a depositarse en las capas inferiores de la muestra, mientras que el hidrogel ocupó las capas de arriba —en contacto con el plato superior del reómetro—, siendo medido y generando esos resultados de recuperación tan altos. Por el contrario, debido al mayor contenido en partículas, en las tintas al 30% de BCP esta separación de fases se produjo de forma menos acusada, reflejando unos valores de recuperación más cercanos a lo esperado (Tabla 3.4-2 y Figura 3.4-3).

Este comportamiento resultó muy significativo como referencia en la preparación del proceso de impresión, y sus implicaciones fueron ensayadas empíricamente: el establecimiento de temperaturas iguales o superiores a 37 °C en el cabezal de impresión provocó la misma separación de fases al aplicar de una cizalla (extrusión) sobre la tinta. De ese modo, el hidrogel fluyó libremente a través de la boquilla, pero las partículas quedaron retenidas en ella hasta provocar su completa obstrucción.

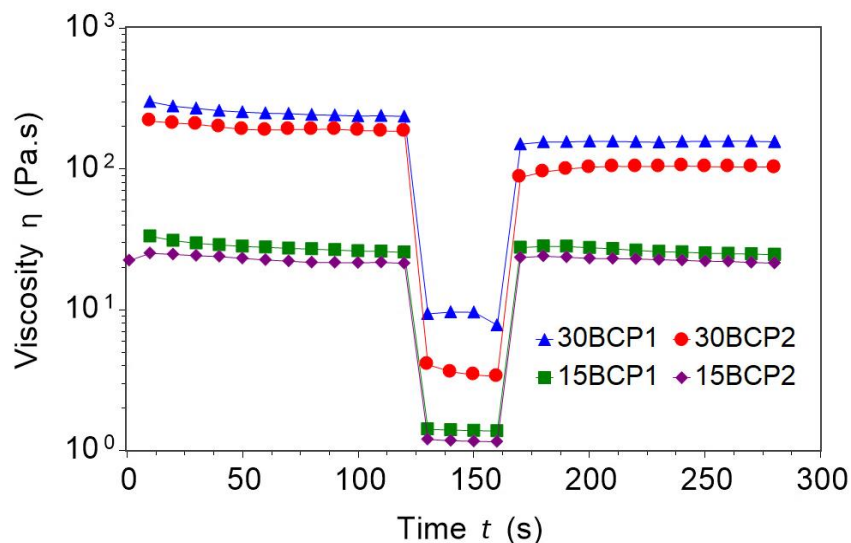


Figura 3.4-2. Ensayo SFM de las tintas de BCP a 37 °C.

Tabla 3.4-2. Disminución y recuperación de la viscosidad (μ) calculados a 37 °C.

	ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3	
	Disminución de μ (%)	Disminución de μ (%)	Recuperación de μ (%) 40 s	120 s
30BCP1	20,26	96,21	64,83	65,15
15BCP1	21,16	94,70	105,69	100,47
30BCP2	13,94	98,08	52,02	53,85
15BCP2	2,99	71,37	87,83	96,77

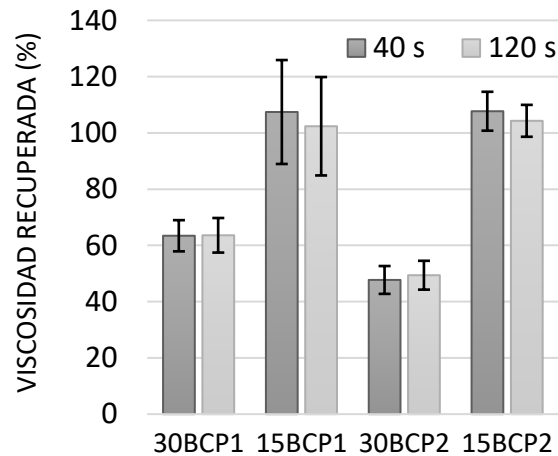


Figura 3.4-3. Representación de los porcentajes de recuperación de la viscosidad calculados transcurridos 40 s y 120 s desde la segunda etapa (100 s^{-1}) a 37°C .

El mismo ensayo SFM se realizó también a temperatura ambiente, buscando medir el comportamiento de las tintas y su estabilidad a velocidades altas de corte estando en una forma menos fluida (Figura 3.4-4). En este caso, ocurrió el fenómeno opuesto: con la aplicación de la alta velocidad de cizallamiento en el segundo paso, las muestras se deslizaron fuera de las placas del reómetro. Por este motivo, los valores de recuperación obtenidos resultaron muy bajos y poco representativos (Tabla 3.4-3 y Figura 3.4-5). Dada la imposibilidad de medir correctamente la tixotropía a temperatura ambiente con la prueba SFM, las muestras se midieron con un ensayo análogo basado en la oscilación de baja amplitud (SDM).

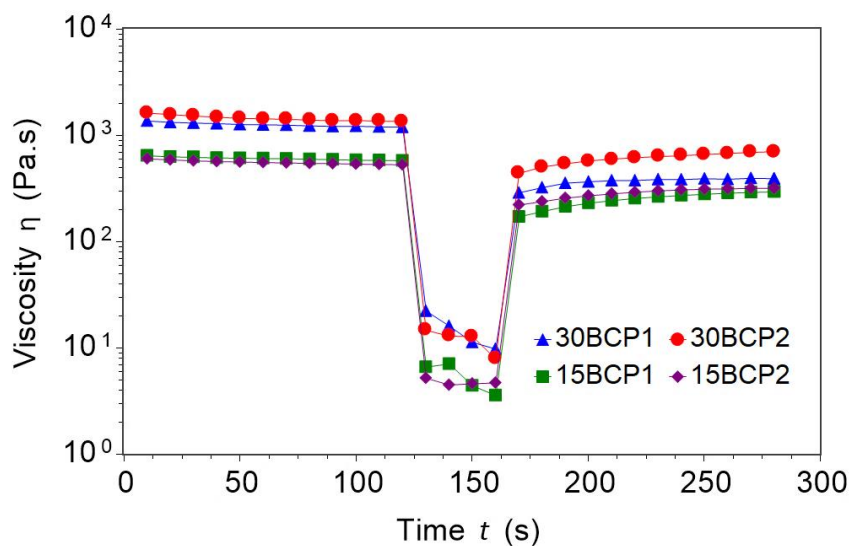
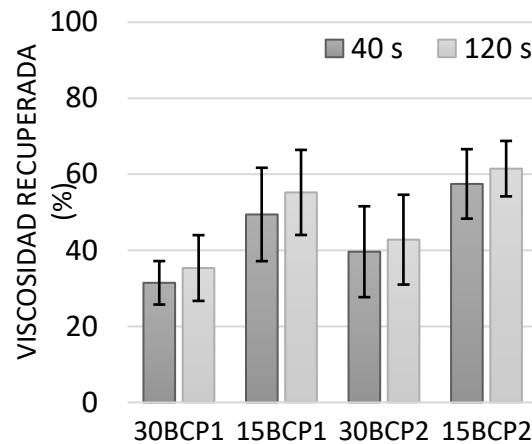


Figura 3.4-4. Ensayo SFM de las tintas de BCP a temperatura ambiente.

Tabla 3.4-3. Disminución y recuperación de la viscosidad (μ) calculados a temperatura ambiente.

	ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3	
	Disminución de	Disminución de	Recuperación de μ (%)	
	μ (%)	μ (%)	40 s	120 s
30BCP1	11,31	98,78	28,16	30,35
15BCP1	8,84	99,08	35,82	42,51
30BCP2	15,37	99,12	38,73	44,23
15BCP2	10,75	99,12	47,19	53,15

Figura 3.4-5. Representación de los porcentajes de recuperación de la viscosidad calculados transcurridos 40 s y 120 s desde la segunda etapa (100 s^{-1}) a temperatura ambiente.

3.4.2.3. Barridos de esfuerzo: determinación de LVR, γ_c y ensayo SDM

Los resultados obtenidos de los barridos de esfuerzo mostraron un valor de deformación crítica menor (γ_c) para las tintas con una mayor concentración de BCP, siendo por tanto estas la de mayor carácter sólido (Figura 3.4-6 y Tabla 3.4-4).

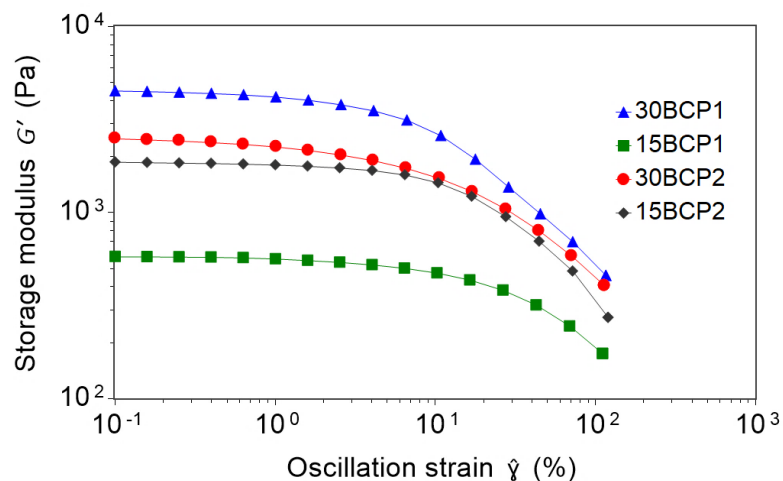


Figura 3.4-6. Barridos de esfuerzo de las tintas de BCP para determinación de la LVR.

Tabla 3.4-4. Valores de deformación crítica (γ_c) para las tintas biomateriales.

	30BCP1	15BCP1	30BCP2	15BCP2
γ_c (%)	2.59	6.43	2.58	6.47

Conociendo el valor de la LVR de las distintas tintas, se estableció una deformación oscilatoria del 20% en la segunda etapa del ensayo SDM garantizar la destrucción de la estructura del fluido y evaluar así correctamente su recuperación (Figura 3.4-7).

Los valores de recuperación de viscosidad a 30 s y 60 s oscilaron entre el 80-90% para las diferentes tintas, a excepción de la tinta 30BCP2 que obtuvo valores ligeramente inferiores (Tabla 3.4-5 y Figura 3.4-8).

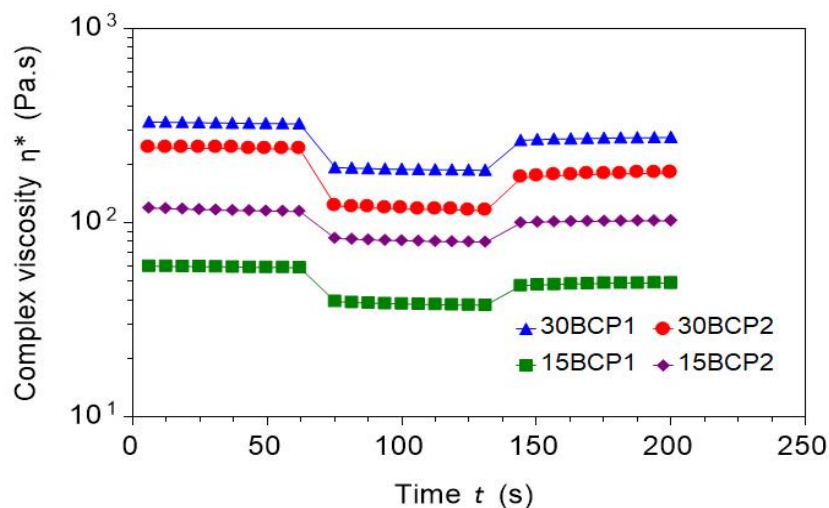


Figura 3.4-7. Ensayo SDM de las tintas de BCP a temperatura ambiente.

Tabla 3.4-5. Disminución y recuperación de la viscosidad (η^*) calculados a temperatura ambiente.

	ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3	
	Disminución de η^* (%)	Disminución de η^* (%)	Recuperación de η^* (%)	
			30 s	60 s
30BCP1	1,79	41,85	83,18	83,69
15BCP1	1,50	35,08	81,80	82,31
30BCP2	1,04	50,95	72,64	73,43
15BCP2	3,37	29,71	87,91	88,30

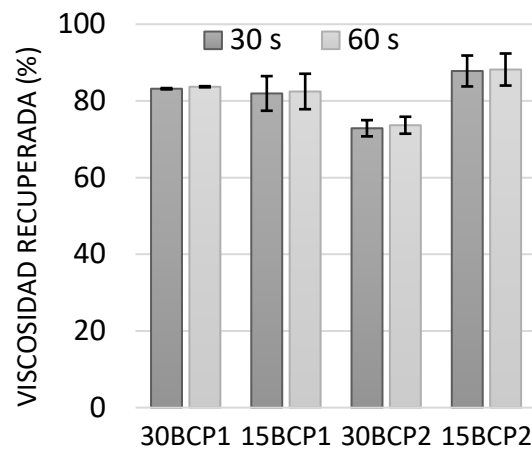


Figura 3.4-8. Representación de los porcentajes de recuperación de la viscosidad calculados transcurridos 30 s y 60 s desde la segunda etapa (20% de oscilación) a temperatura ambiente.

Estas buenas tasas de recuperación hicieron prever una deposición controlada de la tinta y una ejecución fiel de los modelos diseñados durante la impresión 3D. Además, las muestras retiradas del reómetro después del análisis mantenían un aspecto homogéneo, sin separación de fases, concluyendo que unas temperaturas de impresión en torno a 23 °C o ligeramente inferiores mantenían las tintas como un fluido estructurado que resiste la aplicación de cizallamiento.

3.5. Evaluación de la rigidez de la tinta biomaterial y selección del tiempo de reticulación

3.5.1. Materiales y métodos

Con la finalidad de evaluar la rigidez estructural de las tintas BCP y el efecto del tiempo de reticulación sobre esta, se generaron unos discos de material de las mismas características para cada una de las formulaciones. Para lograr piezas del mismo tamaño que los platos del reómetro y asegurar una regularidad en las dimensiones de las muestras a medir, se diseñaron y fabricaron mediante FDM unos moldes de ácido poliláctico (PLA) de dimensiones 25 x 25 x 5 mm. Una vez llenos con las correspondientes muestras, los moldes se taparon con film para evitar la pérdida de agua y se almacenaron a 4°C durante al menos 1 hora.

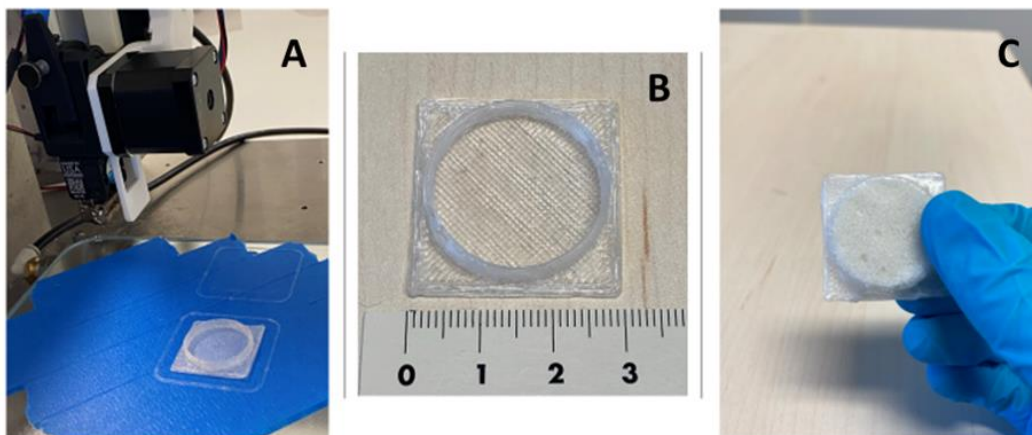


Figura 3.5-1. (A) Proceso de impresión de los moldes de PLA a medida por FDM. (B) Detalle del molde impreso. (C) Muestra de tinta dentro del molde y protegida con film para su conservación a 4 °C.

El efecto del tiempo de reticulación en los discos desmoldados se analizó mediante barridos de amplitud a 23 °C, desde un 0,2% hasta un 2% de deformación, utilizando el mismo reómetro. Las muestras se midieron antes de la reticulación y después de permanecer sumergidas durante 2 y 5 minutos en una solución de CaCl₂ al 0,5% (p/v).

3.5.2. Resultados

La reticulación del alginato presente en las composiciones con CaCl_2 permite lograr una mayor rigidez y manipulabilidad en las muestras impresas. Por tanto, resultaba necesario evaluar el efecto del tiempo de reticulación sobre las propiedades mecánicas en términos de rigidez mediante reología oscilatoria. Las muestras se sometieron a un rango de deformación a una frecuencia fija para determinar el módulo de elasticidad (G') y, por tanto, su rigidez.

Para todas las tintas, los valores de G' aumentaron con el tiempo de exposición a la solución de CaCl_2 , a excepción de 30BCP2 donde disminuyó ligeramente a los 5 minutos en remojo (Figura 3.5-2 a Figura 3.5-5). De entre las muestras sin reticular, aquellas con un 15% de BCP fueron inicialmente mucho más elásticas o débiles, coincidiendo con su mayor contenido de agua. De ese modo, para un mismo tamaño de gránulo, una mayor concentración de partículas condujo a una mayor rigidez de la tinta. Sin embargo, la proporción en la que G' aumentó al prolongar el tiempo de reticulación resultó diferente según el tamaño de partícula. Las muestras con gránulos pequeños (BCP2) sufrieron un aumento notable en la rigidez con solo 2 min de exposición a los iones Ca^{2+} , mientras que para los gránulos de tamaño superior (BCP1) el incremento en la rigidez fue más gradual con el tiempo de exposición.

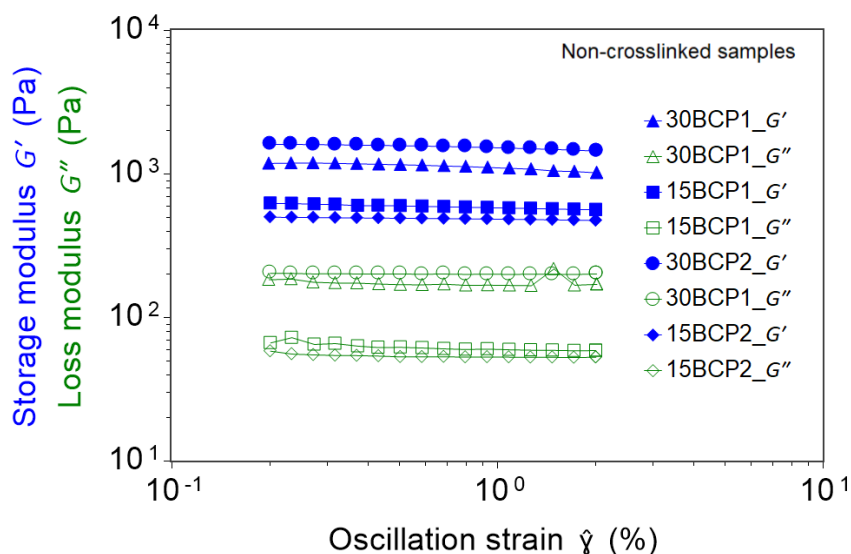


Figura 3.5-2. Rigidez de las muestras de BCP sin reticular.

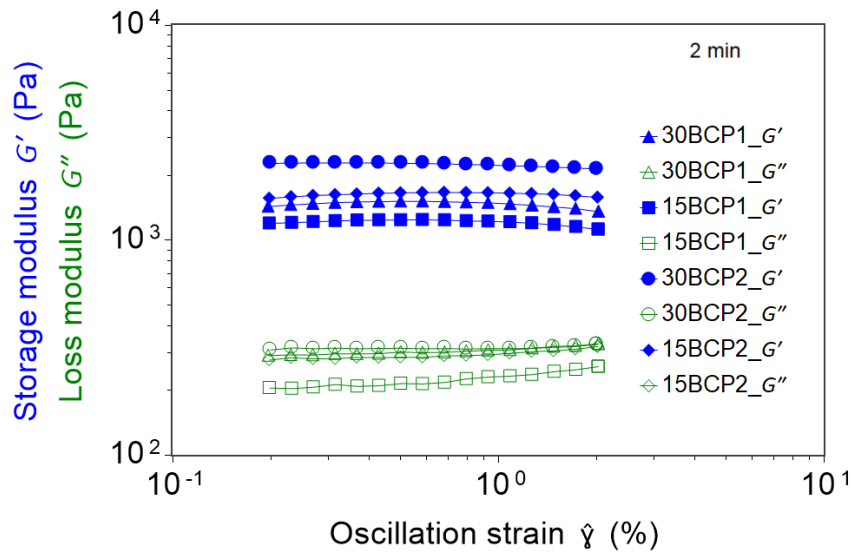


Figura 3.5-3. Rigidez de las muestras de BCP tras 2 minutos sumergidas en solución de CaCl_2 al 0.5% (p/v).

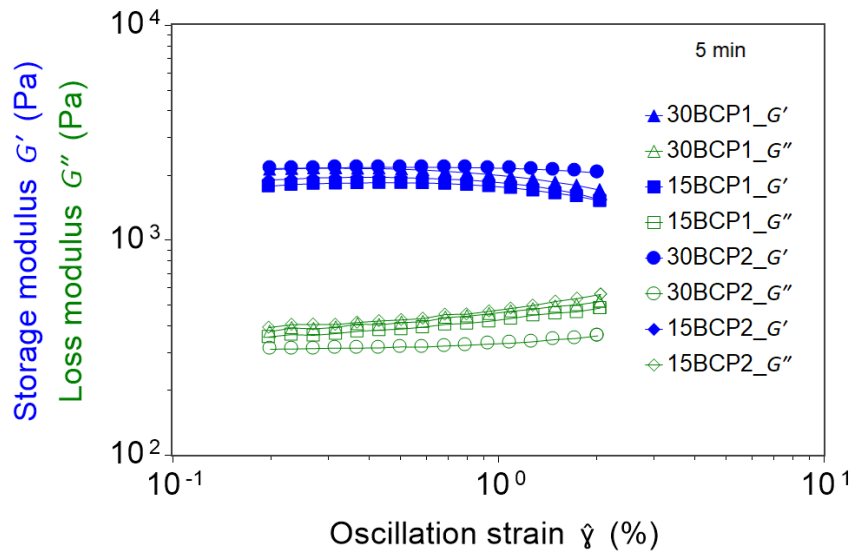


Figura 3.5-4. Rigidez de las muestras de BCP tras 5 minutos sumergidas en solución de CaCl_2 al 0.5% (p/v).

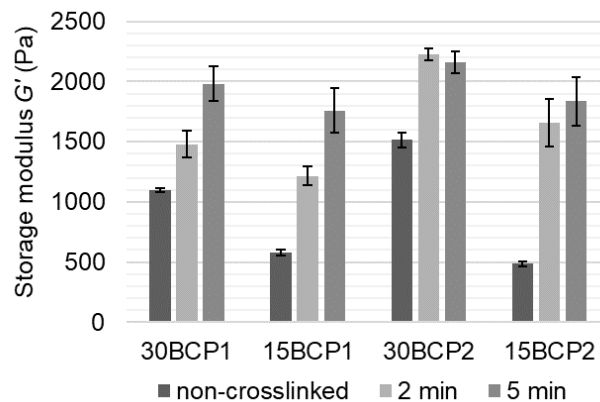


Figura 3.5-5. Gráfica comparativa de los valores de G' al 1% de oscilación para las tintas con diferente grado de reticulación.

Las imágenes microscópicas de los hidrogeles (Figura 3.5-6) revelaron que de entre las tintas más concentradas en BCP, las partículas más pequeñas estaban más empaquetadas y organizadas, de modo que lograban formar una red tridimensional con un tiempo de reticulación más corto. Por el contrario, las partículas grandes estaban dispuestas de una forma menos compacta dentro de la matriz, dejando espacios de hidrogel más grandes e irregulares entre ellas, de tal forma que requerían mayor tiempo en contacto con los iones calcio para reticular el alginato y tardando más en generar una matriz interna que aumente la rigidez de la muestra medida. En cambio, las tintas con 15% de BCP tenían una apariencia similar, con las partículas más dispersas por todo el hidrogel, y alcanzaban valores de rigidez similares después de 5 minutos en una solución de CaCl_2 .

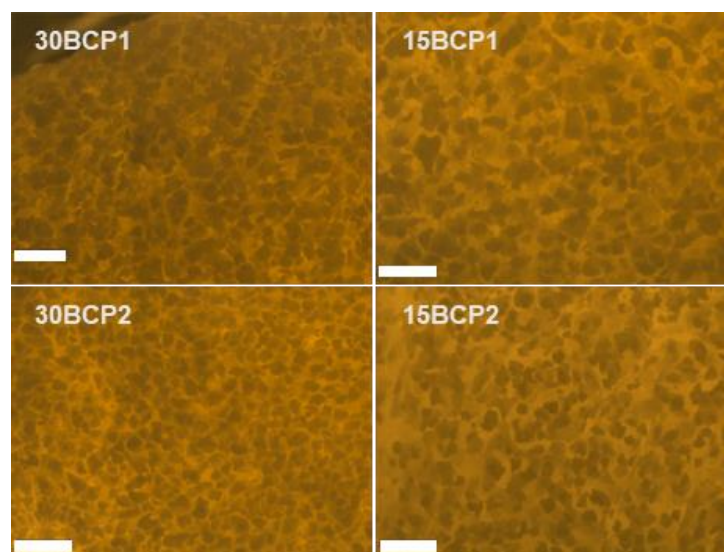


Figura 3.5-6. Imágenes microscópicas de las muestras moldeadas para la evaluación de sus propiedades mecánicas. Las barras de escala equivalen a 1 mm.

3.6. Proceso de impresión

3.6.1. Selección y configuración de los modelos 3D

En este capítulo se trabajó con varios diseños CAD, seleccionados para cumplir con los propósitos de los ensayos a ejecutar. Dos de los modelos (disco y cubo) fueron creados en formato STL con SolidWorks y un tercero más complejo (el diseño de una falange media del dedo del pie) se descargó de la plataforma MakerBot Thingiverse.

Se utilizaron como boquillas puntas dispensadoras de extremo romo de acero inoxidable (Fisnar, Reino Unido) con un diámetro interior de 1,37 mm (15G). Para lograr un flujo correcto, la temperatura del extrusor se fijó en 18 °C para la tinta 30BCP2 y 16 °C para las tintas 15BCP1 y 15BCP2. La temperatura de la base de impresión se ajustó a 15 °C. Se empleó una cámara termográfica (Optris® PI 230; Optris GmbH, Alemania) para visualizar la correcta transición de temperaturas entre la tinta fluyendo a través de la boquilla y la ya depositada en la base (Figura 3.6-1).

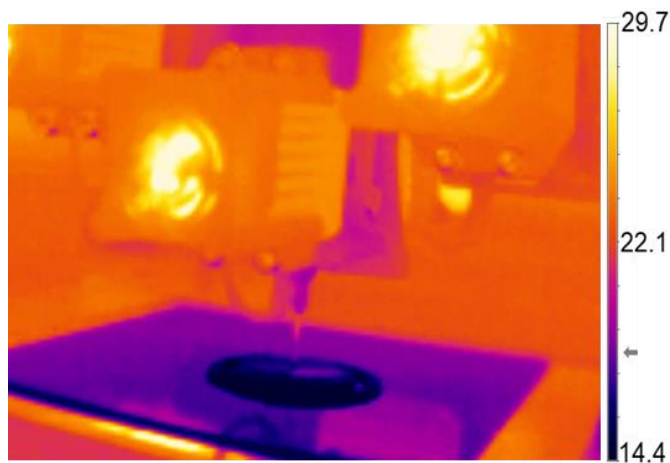


Figura 3.6-1. Imagen termográfica del proceso de impresión de las tintas de BCP.

Al no tener requerimientos de esterilidad ni condiciones especiales de conservación, se utilizaron piezas de vidrio plano como soporte de impresión, de modo que se podían retirar las figuras de forma sencilla, facilitar las tareas de limpieza y reducir el tiempo de espera entre procesos de impresión.

Para cada ensayo, el modelo 3D seleccionado se importó al software de corte de código abierto (Slic3r), desde el cual se exportaron diferentes versiones de archivo G-code según los parámetros de impresión establecidos (Tabla 3.6-1).

Tabla 3.6-1. Parámetros de impresión empleados en los distintos modelos 3D.

			
Modelo 3D	Disco	Cubo	Falange
Velocidad primera capa	8	8	8
Diámetro de boquilla	1,37 mm	1,37 mm	1,37 mm
Ángulo de relleno	45	90	90
Densidad de relleno	60 / 75	60	60
Patrón de relleno	Rectilíneo / panal de abeja	Rectilíneo	Rectilíneo
Perímetros	2	2	2
Capas sólidas superiores	0	0	0
Capas sólidas inferiores	0	0	1
Altura primera capa	1 mm	1 mm	1 mm
Altura de capa	1 mm	1 mm	1 mm
Tiempo de impresión aproximado	2 min	2 min	3 min

Para seleccionar una velocidad de impresión adecuada, se imprimieron cuadrados simples por triplicado a tres velocidades diferentes (5 mm/s, 8 mm/s y 15 mm/s). La homogeneidad

y el grosor de los trazos impresos se valoraron bajo el microscopio para evaluar la velocidad de impresión más apropiada.

El grosor de trazo obtenido varió en función de la tinta empleada y de la velocidad establecida, sin seguir un patrón definido (Tabla 3.6-2 y Figura 3.6-2). Sin embargo, la desviación fue significativamente inferior a la velocidad de 8 mm/s, de modo que los trazos conseguidos resultaban más uniformes. Por ese motivo, la velocidad seleccionada para los trabajos de impresión fue 8 mm/s.

Tabla 3.6-2. Grosor del trazo (mm) en función de la velocidad de impresión

	5 mm/s	8 mm/s	15 mm/s
15BCP1	1,214	1,485	1,369
	1,214	1,433	1,382
	1,304	1,368	1,614
Promedio	1,244	1,429	1,455
SD	0,05	0,06	0,14
30BCP2	1,445	1,350	1,383
	1,407	1,336	1,435
	1,407	1,321	1,421
Promedio	1,420	1,336	1,413
SD	0,02	0,01	0,03
15BCP2	1,627	1,510	1,524
	1,549	1,446	1,394
	1,407	1,407	1,485
Promedio	1,528	1,454	1,468
SD	0,11	0,05	0,07

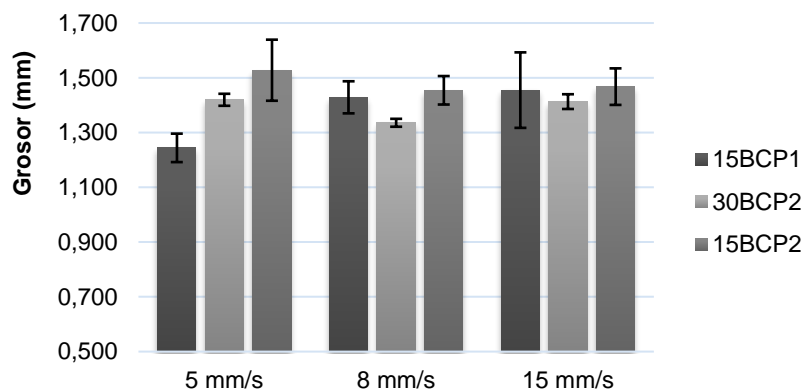


Figura 3.6-2. Representación del grosor del trazo y su desviación estándar a distintas velocidades.

El siguiente paso realizado fue la calibración del ancho de extrusión. Para lograrlo, se imprimió un cilindro hueco y se fue aumentando progresivamente el valor del ancho de extrusión hasta conseguir que la figura se ejecutase correctamente. En este caso, el valor se fijó en un 140% (Figura 3.6-3).

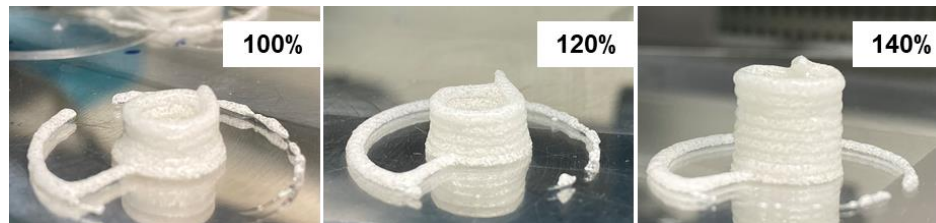


Figura 3.6-3. Ajuste del ancho de extrusión de las tintas BCP.

Finalmente, se imprimió el modelo 3D de una falange del pie para evaluar la ejecución de estructuras más complejas y con formas redondeadas. Las tres tintas fueron aptas para la ejecución del modelo y conservaron correctamente la forma impresa también tras un proceso de secado a temperatura ambiente (Figura 3.6-4), siendo totalmente manipulables y resistentes.

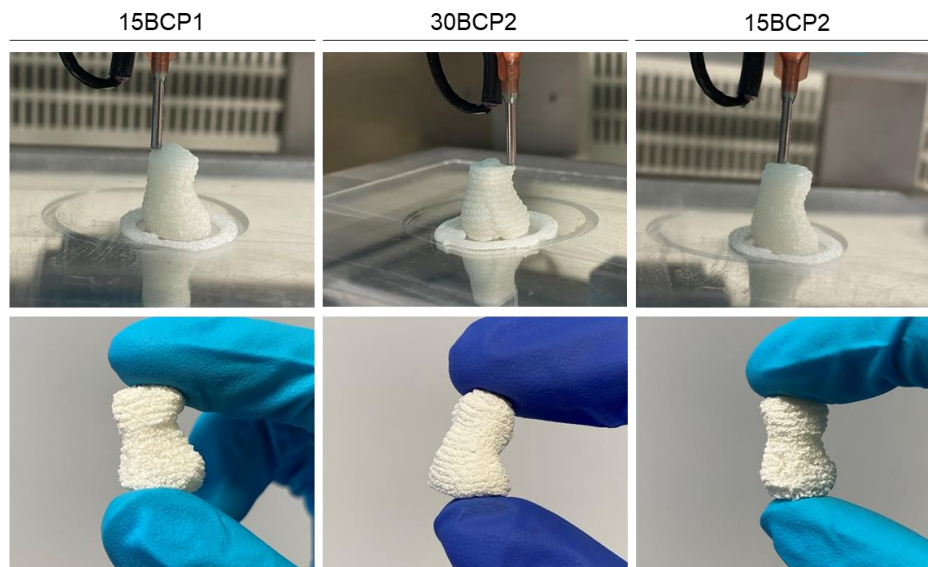


Figura 3.6-4. Modelo de falange impreso con las tintas de BCP y aspecto de las figuras deshidratadas finales.

3.7. Evaluación de la rigidez de las estructuras en función de los parámetros de impresión

3.7.1. Materiales y métodos

Como consecuencia del uso previsto para este tipo de tintas —ideadas para llegar a imprimir futuros injertos óseos de escala centimétrica—, además de evaluar el efecto del tiempo de reticulación visto en la sección 3.5 de este capítulo, resulta de especial relevancia conocer de qué modo los parámetros de impresión seleccionados pueden implicar cambios en la resistencia mecánica o en la durabilidad de estas estructuras impresas.

De ese modo, empleando el modelo 3D de disco de 25 mm de diámetro, se configuraron distintas estructuras combinando el patrón de relleno rectilíneo o panal de abeja con dos densidades de relleno (60% y 75%). Se imprimieron así cuatro figuras diferentes (Figura 3.7-1^a) utilizando las tres tintas imprimibles (15BCP1, 30BCP2 y 15BCP2). En la generación del Gcode mediante Slic3r, se agregó una falda doble a las piezas de modo que se asegurara un flujo de tinta continuo previo a la ejecución de la figura.

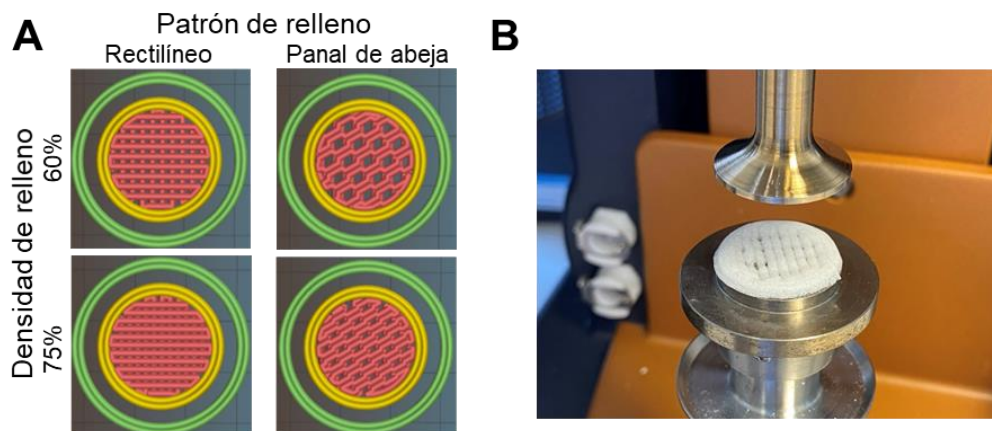


Figura 3.7-1. (A) Previsualización en Slic3r de las estructuras resultantes de la combinación de dos patrones de relleno con dos porcentajes de relleno. (B) Detalle de la colocación de un disco impreso entre los platos del reómetro con el mismo tamaño (25 mm).

La rigidez de las matrices impresas se midió realizando barridos de amplitud de 0,2% a 2% de deformación, de forma similar a como se describe en la sección 3.5. Una vez terminadas, las muestras se embebieron en una solución de CaCl_2 al 0,5% (p/v) durante 2 min y luego se lavaron dos veces con agua desionizada antes del ensayo. Gracias a sus dimensiones y a su correcta manipulabilidad, las figuras pudieron ser colocadas en los platos del reómetro sin comprometer su integridad (Figura 3.7-1B).

3.7.2. Resultados

Las cuatro estructuras resultantes de la combinación de los parámetros de impresión se ejecutaron de forma correcta y precisa con las tres tintas imprimibles (Figura 3.7-2). Las faldas añadidas en la configuración de los modelos cumplieron con su objetivo de asegurar el correcto flujo de la tinta antes de empezar a imprimir la estructura deseada, evitando así la aparición de defectos en las piezas.

La observación microscópica de las figuras reveló una distribución uniforme de las partículas de BCP en los filamentos que conforman las estructuras. Una vez depositados, estos trazos impresos quedaban definidos y se podían distinguir de manera clara, especialmente en el caso de 30BCP2. En figuras con mayor porcentaje de relleno, los filamentos depositados tendían a juntarse entre ellos, pero no se fusionaban completamente. Este hecho resultó indicativo de una buena recuperación de las propiedades viscoelásticas de las tintas después de su extrusión, propiedad fundamental para lograr una ejecución satisfactoria de los modelos 3D —especialmente aquellos con una longitud sustancial en el eje Z—.

En referencia a la rigidez de la matriz, comparando los valores del módulo elástico (G') al 1% de deformación, los resultados más altos correspondieron en todos los casos a la tinta 30BCP2, independientemente del patrón o del porcentaje de relleno fijado (Figura 3.7-3 a Figura 3.7-5). Debido a la mayor concentración de partículas sólidas, resultaba previsible que las figuras impresas con esta tinta tuvieran un mayor valor de módulo elástico ya que los gránulos de BCP potencian las propiedades biomecánicas de la estructura. Entre diferentes patrones de relleno, las figuras con relleno rectilíneo obtuvieron valores de G' mayores. Sin embargo, para el mismo patrón, las que contaban con un porcentaje de relleno menor tuvieron una rigidez más alta (Figura 3.7-6). Este efecto fue debido a que las

estructuras más porosas contaban con una mayor superficie de contacto con la solución de CaCl_2 , provocando una mayor reticulación del alginato y, por lo tanto, mayor rigidez.

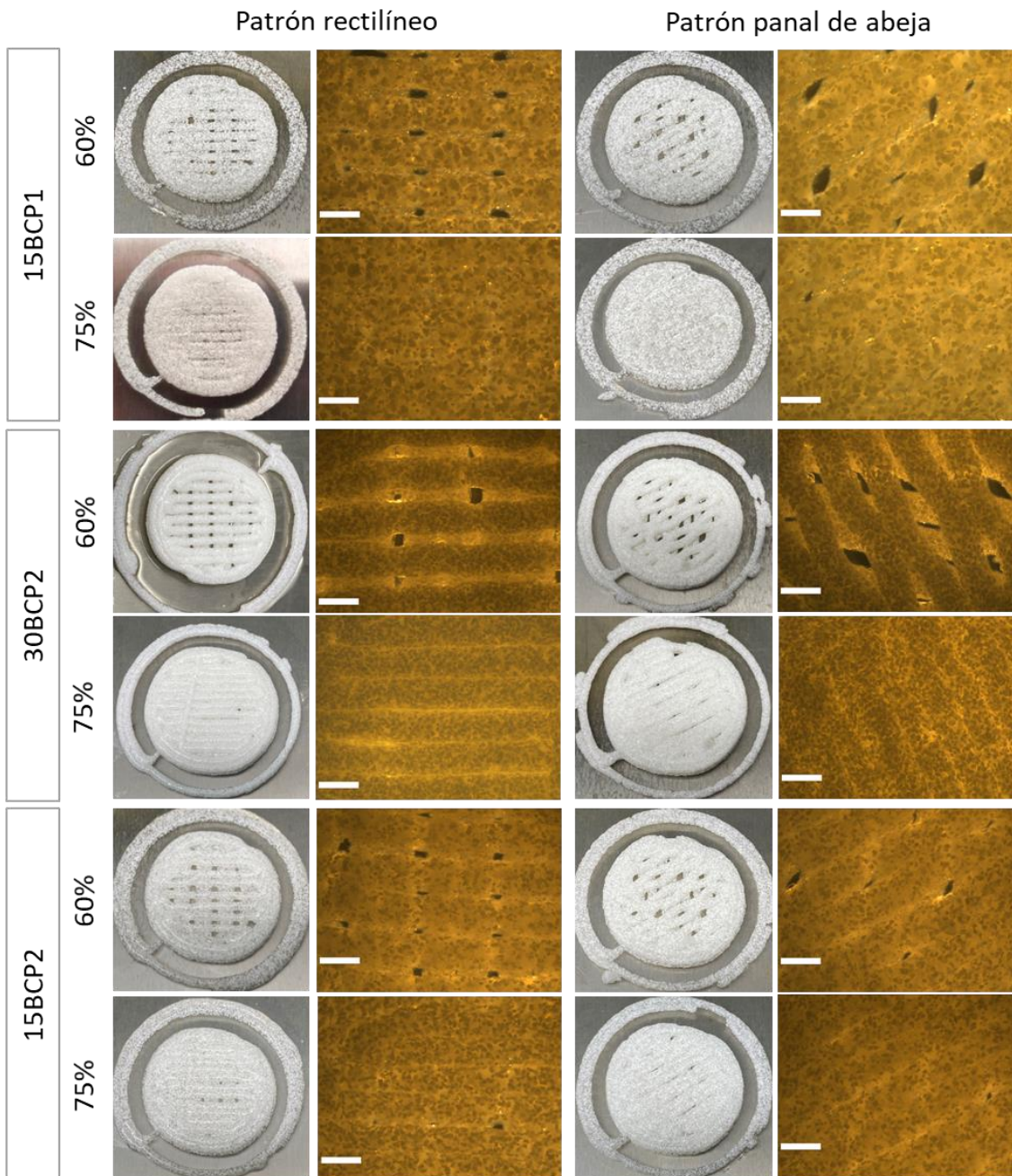


Figura 3.7-2. Imágenes fotográficas y microscópicas de los discos impresos con diferentes parámetros. Barras de escala: 2 mm.

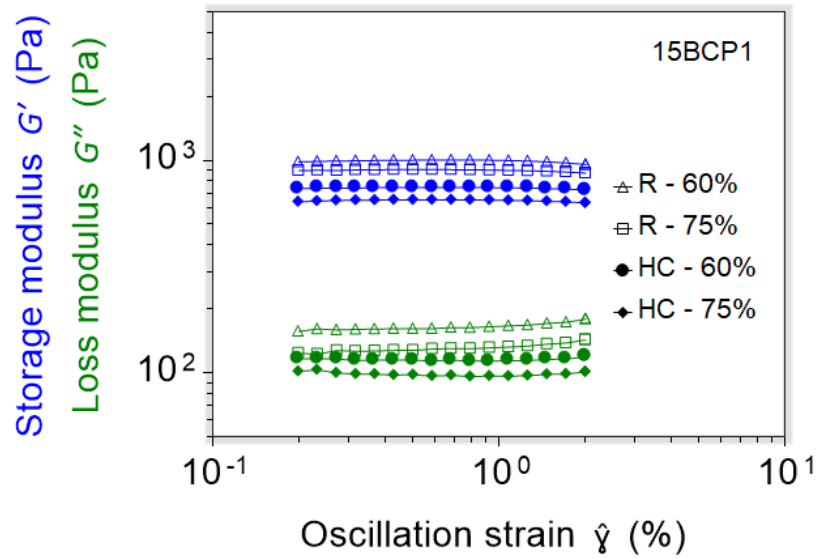


Figura 3.7-3. Barridos de amplitud para determinar la rigidez de las figuras impresas en 3D con la tinta 15BCP1.

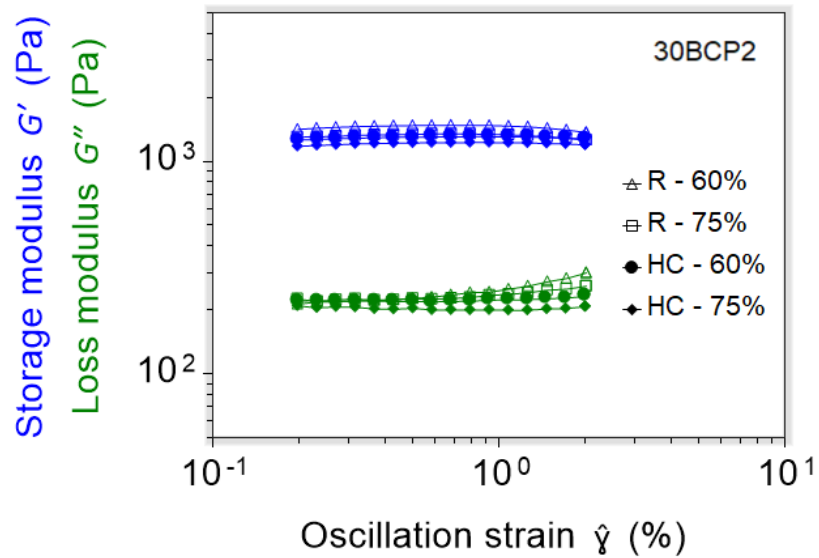


Figura 3.7-4. Barridos de amplitud para determinar la rigidez de las figuras impresas en 3D con la tinta 30BCP2.

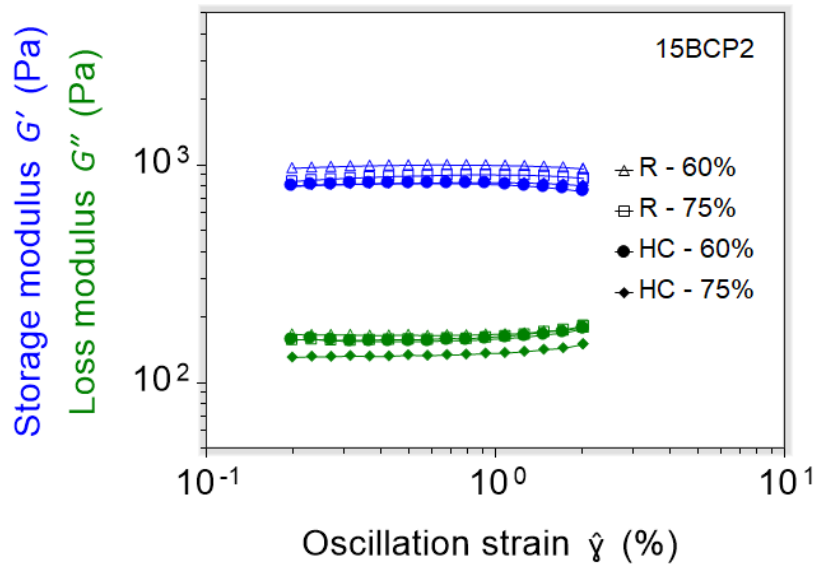


Figura 3.7-5. Barridos de amplitud para determinar la rigidez de las figuras impresas en 3D con la tinta 15BCP2.

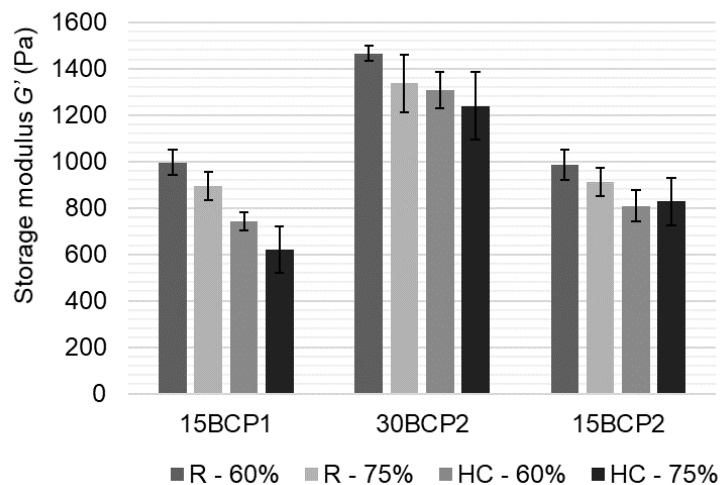


Figura 3.7-6. Valores de G' al 1% de deformación para patrones rectilíneos (R) y panal de abeja (HC) al 60% o 75% de relleno (D).

De esta forma, se evidenció que no solo la composición de la tinta, sino también los parámetros de impresión influyen notablemente en las propiedades biomecánicas de las estructuras fabricadas. En consecuencia, deben tenerse en cuenta y evaluarse adecuadamente porque, como ya han demostrado otros autores, el comportamiento celular en términos de adhesión, proliferación, migración y diferenciación de las células del tejido óseo podría verse afectado por la rigidez del material.²²⁷⁻²³⁰

3.8. Estudio de la proporción de hinchamiento de las tintas de BCP en estructuras tridimensionales impresas

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales fuertemente hidrofílicas que pueden absorber grandes cantidades de agua y que imitan las características de la matriz extracelular de los tejidos nativos, proporcionando a las células un soporte mecánico temporal y garantizando un adecuado intercambio de nutrientes y de gases. De ese modo, las matrices de hidrogel se pueden utilizar como andamios implantables pues proporcionan un microambiente ideal para la proliferación y la diferenciación celular, permitiendo que las células óseas encapsuladas o migradas hacia el hidrogel crezcan y secreten nueva matriz extracelular para la restauración del tejido óseo dañado.²³⁰

En respuesta a estímulos externos, los hidrogeles pueden mostrar un cambio medible de volumen. La absorción de agua es la forma más común de estímulo externo y está influida por el grado de reticulación que delimita el área permitida para la difusión a través de la red de hidrogel.²³¹

La capacidad para absorber agua de un hidrogel se representa a partir de la proporción de hinchamiento (SR, del inglés Swelling Ratio) que se muestra en la ecuación siguiente:

$$SR\% = \frac{(W_f - W_i)}{W_i} \times 100$$

donde W_i y W_f representan la masa de las muestras de hidrogel antes y después del proceso de absorción de agua, respectivamente.

3.8.1. Materiales y métodos

Para evaluar la capacidad de absorción de agua de las tintas de BCP una vez generada una estructura tridimensional con ellas, se imprimieron seis cubos (10 x 10 x 10 mm) con cada una de las tintas cerámicas aptas (15BCP1, 30BCP2 y 15BCP2). Las figuras se reticularon con una solución de CaCl_2 al 0,5% (p/v) durante 2 min y posteriormente se

lavaron por duplicado con agua desionizada para eliminar los posibles restos de cloruro de calcio. Las muestras se dividieron en dos grupos para la realización de dos pruebas distintas.

En el primer grupo, los cubos recién reticulados ($n = 9$) se sumergieron inmediatamente en un volumen de PBS suficiente para cubrirlos por completo, a pH 7,4 y temperatura ambiente. Se determinó la masa de cada muestra mediante un procedimiento de pesado, retirando el agua sobrante con papel absorbente, a intervalos de tiempo predeterminados de 1, 2, 3, 4, 5 y 24 h.

Los cubos restantes ($n = 9$) se dejaron secar a temperatura ambiente y se pesaron hasta que se determinó una masa estable. Una vez secos, se midieron para evaluar la contracción de la estructura con el proceso de deshidratación. El proceso de rehidratación y la determinación del SR% se realizó de manera similar al grupo anterior, introduciendo los cubos deshidratados en volumen suficiente PBS y pesándolos en los mismos intervalos de tiempo. En todos los casos, la proporción de hinchamiento (SR%) de los hidrogeles de BCP se calculó siguiendo la ecuación general mencionada anteriormente.

3.8.2. Resultados

Todos los cubos impresos con las tres tintas de BCP reprodujeron con éxito el modelo 3D tanto en sus dimensiones como en su apariencia (Figura 3.8-1). Debido a su mayor contenido en BCP, las figuras impresas con 30BCP2 tenían un aspecto más opaco y eran más rígidas al tacto incluso sin reticular. Por el contrario, las tintas al 15% de BCP eran ligeramente translúcidas. A su vez, una vez terminadas, los trazos y las capas estaban mucho más definidas y eran comparativamente más identificables en los cubos impresos con 30BCP2, fenómeno que ya había sido observado anteriormente en las imágenes microscópicas de los discos impresos con distintos parámetros de impresión (Figura 3.7-2). El primer grupo de muestras se introdujo en PBS justo después de su reticulación y lavado. Al contacto con este medio líquido, sin contenido en Ca^{2+} ni en otros cationes divalentes, se produjo una reacción de intercambio entre los iones de calcio culpables de reticular de la estructura impresa y los iones de sodio en el PBS, rompiendo las reticulaciones en el alginato y permitiendo que el agua entre en el hidrogel.²³² Para estas muestras frescas, los perfiles de hinchamiento difirieron en función del tamaño de los gránulos.

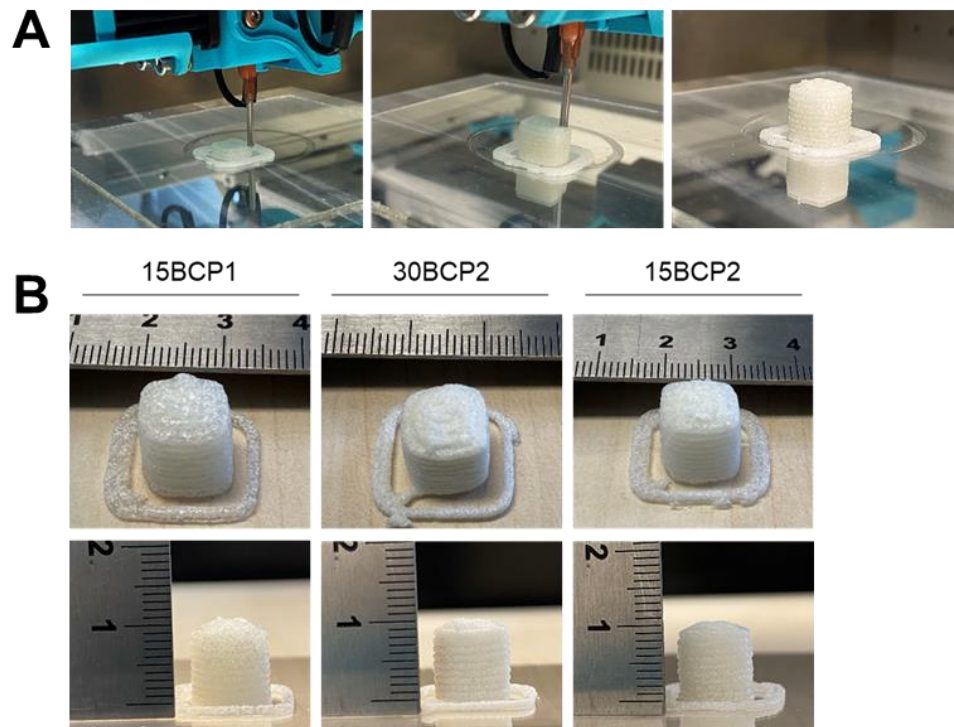


Figura 3.8-1. (A) Proceso de impresión de los cubos. (B) Detalle del aspecto y las dimensiones de los cubos impresos.

Los resultados recopilados a los diferentes intervalos de tiempo (Figura 3.8-2 y Tabla 3.8-1) muestran como la masa y, en consecuencia, la SR% de los cubos impresos con 15BCP1 aumentó progresivamente con el paso de los minutos. Sin embargo, los cubos de 30BCP2 y 15BCP2 mostraron un menor SR% transcurridas de 3 horas del ensayo al producirse una disminución en su masa.

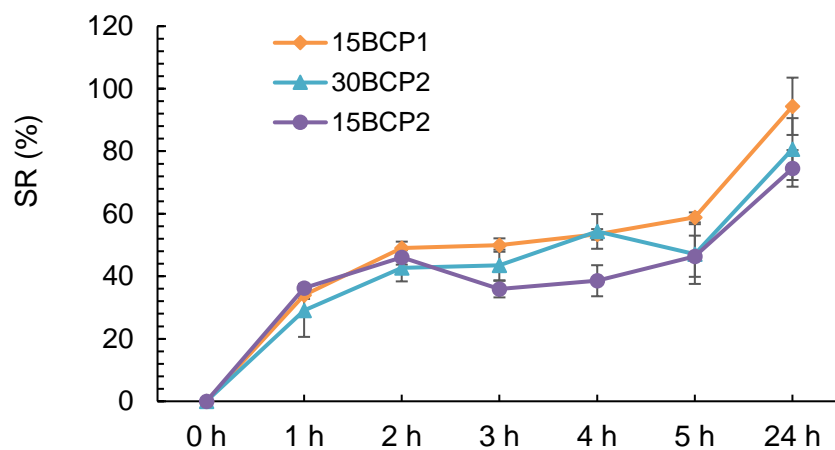


Figura 3.8-2. Proporción de hinchamiento (SR%) calculado para los cubos frescos introducidos en PBS.

Tabla 3.8-1. Masa (g) de los cubos frescos sumergidos en PBS y SR% calculados.

	15BCP1			30BCP2			15BCP1		
T=0 min (g)	1,365	1,385	1,378	1,543	1,515	1,543	1,340	1,355	1,298
T= 1 h (g)	1,846	1,854	1,830	1,883	1,920	2,058	1,825	1,830	1,785
SR%	35,24	33,86	32,80	22,03	26,73	28,49	36,19	35,09	37,52
Promedio	33,97			29,09			36,26		
SD	1,22			8,48			1,23		
T= 2 h (g)	2,062	2,065	2,026	2,142	2,150	2,191	1,982	1,988	1,862
SR%	51,06	49,10	47,02	38,82	41,91	47,44	47,91	46,72	43,45
Promedio	49,06			42,73			46,03		
SD	2,02			4,37			2,31		
T= 3 h (g)	2,053	2,045	2,093	2,146	2,160	2,213	1,838	1,800	1,790
SR%	50,40	47,65	51,89	39,08	42,57	48,92	37,16	32,84	37,90
Promedio	49,98			43,53			35,97		
SD	2,15			4,99			2,73		
T= 4 h (g)	2,092	2,102	2,138	2,304	2,324	2,382	1,830	1,828	1,872
SR%	53,26	51,77	55,15	49,32	53,40	60,30	36,57	34,91	44,22
Promedio	53,39			54,34			38,57		
SD	1,70			5,55			4,97		
5h (g)	2,163	2,181	2,213	2,109	2,260	2,310	1,930	1,915	1,997
SR%	58,46	57,47	60,60	36,68	49,17	55,45	44,03	41,33	53,85
Promedio	58,84			47,10			46,40		
SD	1,60			9,55			6,59		
24h (g)	2,590	2,610	2,824	2,618	2,781	2,806	2,282	2,331	2,352
SR%	89,74	88,45	104,93	69,67	83,56	88,83	70,30	72,03	81,20
Promedio	94,38			80,69			74,51		
SD	9,17			9,90			5,86		

Este resultado no fue debido a una menor captación de agua por parte del hidrogel sino a que las partículas contenidas en estas tintas (gránulos de tipo BCP2, de menor tamaño) se desprendieron de la matriz de hidrogel y se depositaron en el fondo de la placa desde el minuto 60 en remojo en PBS. Tras 24 horas de incubación, la de SR% para los cubos de 15BCP1 alcanzó el 94%, mientras que los valores para 30BCP2 y 15BCP2 fueron solo del 80% y 74%, respectivamente, debido a una liberación de partículas mayor y más rápida con respecto a las muestras de 15BCP1.

En cuanto a las muestras deshidratadas, las figuras impresas con hidrogeles de BCP al 15% en peso perdieron casi el 80% de su peso durante el proceso de secado debido a su mayor contenido de agua. En consecuencia, la contracción de la figura también fue mayor para los cubos 15BCP1 y 15BCP2, con una reducción del tamaño superior al 30% (Tabla 3.8-12). La Figura 3.8-3 muestra el aspecto de los cubos deshidratados, donde se puede apreciar la diferencia significativa de tamaño entre las figuras impresas con mayor o menor contenido en BCP. En línea con resultados anteriores, en el caso de los cubos de BCP2, las capas continuaron siendo totalmente identificables (incluso pudiendo contarse a simple vista), mientras que para el resto de los cubos las capas se fusionaron completamente.

Tabla 3.8-2. Masas (m) y alturas (h) iniciales y finales de los cubos impresos y deshidratados.

	M_i (g)	m_f (g)	Pérdida masa (%)	Promedio \pm SD	h_i (mm)	h_f (mm)	Pérdida altura (%)	Promedio \pm SD
15BCP1	1,391	0,283	79,65	79,09 \pm 0,66	102	70	31,37	31,03 \pm 0,34
	1,365	0,293	78,53		101	70	30,69	
	1,385	0,281	79,71		100	69	31,00	
30BCP2	1,528	0,545	64,33	64,36 \pm 0,76	100	95	5,00	6,00 \pm 1,49
	1,410	0,502	64,40		100	93	7,00	
	1,515	0,520	65,68		101	93	7,92	
15BCP2	1,345	0,278	79,33	78,87 \pm 0,40	101	68	32,67	32,67 \pm 0,67
	1,351	0,289	78,61		100	68	32,00	
	1,355	0,289	78,67		102	68	33,33	

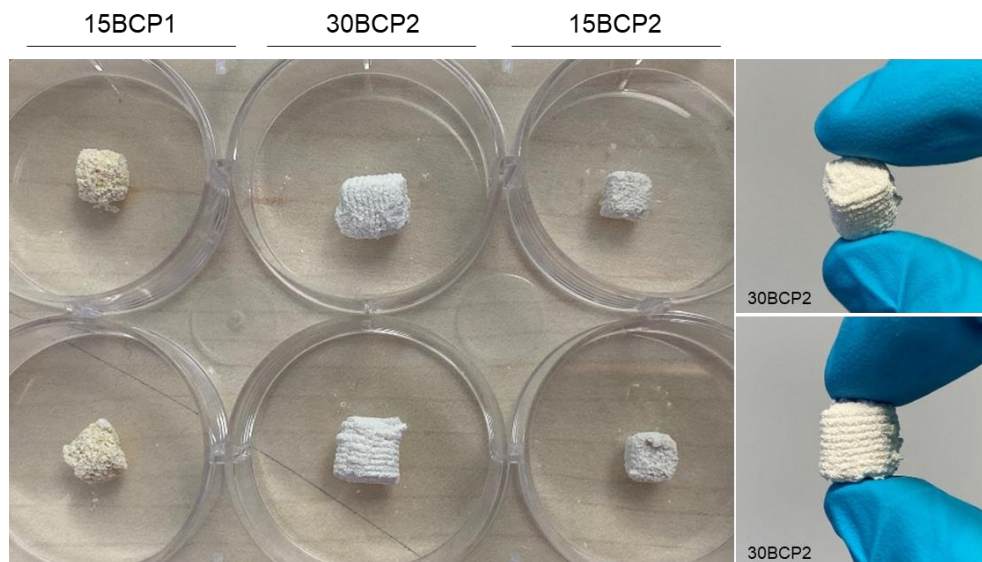


Figura 3.8-3. Aspecto de los cubos deshidratados.

Debido a la fuerte hidrofiliya y capacidad de hinchamiento del alginato de sodio y los geles de gelatina,¹⁷⁸ la proporción de hinchamiento de los cubos impresos aumentó notablemente con el tiempo de remojo, incluso después de haber sufrido etapas de reticulación y deshidratación (Figura 3.8-4). Los valores de SR% en el tiempo difirieron notablemente dependiendo de la composición del hidrogel: mientras que para los hidrogeles de 15BCP1 y 15BCP2 el SR% alcanzó el 600% después de 24 horas, para las muestras de 30BCP2 el SR% fue solo del 275%. Tal y como se aprecia en la Figura 3.8-5, los cubos impresos con 30BCP2 sufrieron una desintegración más rápida durante el proceso de rehidratación. De esa forma, mientras que los cubos de 15BCP1 y 15BCP2 mantuvieron su forma después de 24 h de remojo, las muestras de 30BCP2 se rompieron notablemente, disminuyendo el peso de la estructura restante final y, en consecuencia, reduciendo el valor de SR%.

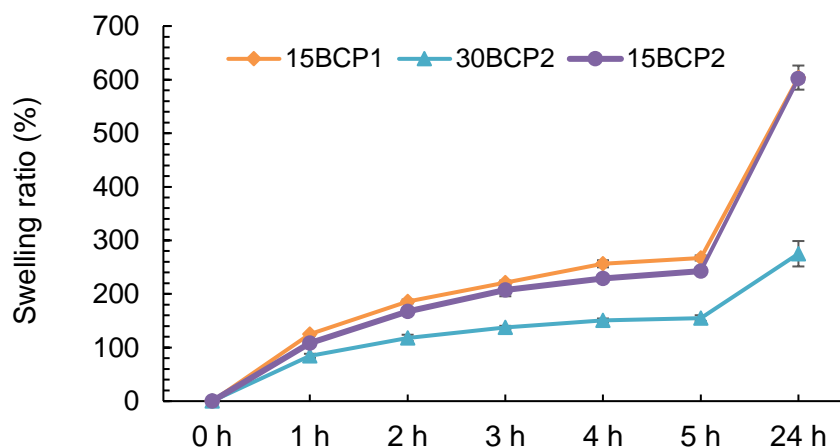


Figura 3.8-4. Proporción de hinchamiento (SR%) calculado para los cubos deshidratados introducidos en PBS.

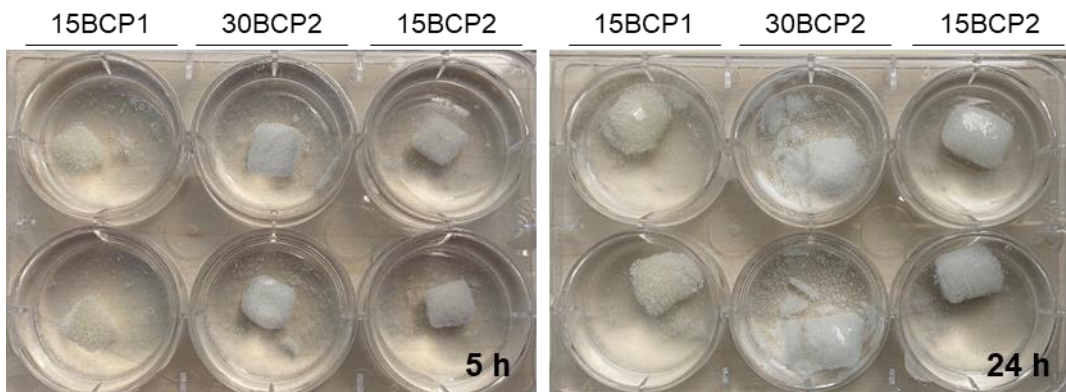


Figura 3.8-5. Imágenes de las figuras rehidratadas transcurridas 5 horas (izq.) y 24 horas (dcha.) sumergidas en PBS.

Los materiales con mayor capacidad de absorción de agua, como los empleados en estas formulaciones, facilitan la humectabilidad de las estructuras y posteriormente permiten la adhesión, proliferación y migración de las células durante el proceso de diferenciación.¹⁷⁸ Sin embargo, este proceso de desintegración tan rápido podría no ser adecuado para la adhesión o integración celular y, en este caso, para el uso de hidrogeles al 30% de BCP que sean sometidos a etapas de deshidratación o liofilización pueden ser necesarias matrices reticuladas más fuertes.

3.9. Valoración del capítulo

Debido a la alta incidencia y prevalencia de casos de osteoporosis y traumatismos mayores en la actualidad, la búsqueda de alternativas para lograr una correcta reparación ósea sigue siendo objeto de interés. Algunas fracturas o lesiones mayores causadas por la pérdida de grandes cantidades de hueso no pueden curarse por sí mismas y requieren del empleo de biomateriales como sustitutos o material de relleno para restaurar las propiedades mecánicas del órgano dañado. A diferencia a otras opciones ya empleadas hasta la fecha, como los injertos autólogos de hueso, la impresión 3D proporciona beneficios particulares asociados con la posibilidad de crear implantes bajo demanda adaptados a las necesidades reales del paciente: composición, tamaño, forma, porosidad o tiempo de reabsorción.

Siguiendo esa línea, en este capítulo se han generado nuevas tintas de biomaterial cerámico mediante la combinación de un hidrogel compuesto por tres hidrocoloides (gelatina tipo A, alginato sódico y goma xantana) con partículas de fosfato cálcico bifásico de tamaños entre 150 y 500 μm . Tras una evaluación detallada de las propiedades reológicas y mecánicas de las distintas formulaciones conseguidas, se ha determinado que tanto la concentración como el tamaño de las partículas incorporadas tienen una influencia significativa en el comportamiento de las tintas, afectando directamente a su extrudabilidad y por ende, a su potencial uso en tecnologías de impresión de tipo SSE. De ese modo, solamente tres de las cuatro combinaciones de hidrogel y partículas de BCP han resultado tener una adecuada imprimibilidad, determinada por un comportamiento reológico de tipo pseudoplástico, una estabilidad suficiente de la matriz de hidrogel para retener las partículas embebidas incluso estando sometida a esfuerzos, y un alto porcentaje de recuperación de la viscosidad tras la extrusión que permita la correcta deposición de capas de material sin que la figura impresa colapse. Además, estas tintas permiten que la rigidez de la estructura final sea modulada mediante variables como el tiempo de reticulación con CaCl_2 aplicado o la distinta configuración de los propios parámetros del proceso de impresión propiamente dicho, como el porcentaje o el patrón de relleno seleccionado. Sin embargo, estas variables también afectarán a otras propiedades relevantes del sistema,

en particular la porosidad, permeabilidad e incluso, su citocompatibilidad, lo que hace necesario un ajuste fino del diseño del material para obtener combinaciones adecuadas de propiedades mecánicas, estructurales y biológicas. Asimismo, también se ha detectado que la proporción de hinchamiento de las estructuras impresas —que representa la habilidad para retener y difundir la solución e imitar la capacidad de las construcciones para absorber el fluido corporal—, está influenciada por el postprocesamiento aplicado a las estructuras impresas, tal como los procedimientos de secado, además de por la propia composición de la matriz. De esta manera, la combinación de todos estos factores genera estructuras impresas con rigidez, hinchazón o degradación totalmente ajustables, donde todo se puede modular en términos de lograr una mejor adhesión e interacción celular, potenciar la osteoconductividad de las partículas de BCP y promover la cicatrización ósea, aptitudes que deben ser testadas mediante ensayos *in vitro* y estudiadas en profundidad en futuros desarrollos o proyectos de IDONIAL que den continuidad a los resultados aquí obtenidos.

3.10. Conclusiones

- La correcta combinación de alginato sódico, gelatina y goma xantana genera hidrogeles capaces de vehiculizar partículas de BCP de gran tamaño y forma irregular, dando lugar a nuevas tintas biomateriales cerámicas estables y homogéneas en su composición.
- El tamaño y la concentración de partículas presentes en la tinta afectan notablemente a su extrudabilidad y determinan sus propiedades reológicas.
- La rigidez de las estructuras finales puede modularse mediante la modificación de los parámetros de impresión o el ajuste del tiempo de reticulación.
- La capacidad de absorción de fluidos de las figuras impresas depende tanto de la composición de la tinta con la que están fabricadas, como de los métodos de postprocesado que se le aplican.
- La buena imprimibilidad de las fórmulas conseguidas permite la fabricación de estructuras tridimensionales a escala centimétrica con una buena resolución, ejecución y consecución de forma, posibilitando una futura creación de pequeños bioimplantes específicos para cada paciente y a demanda.

Capítulo 4.

Impresión de medicamentos paciente- específicos en forma de gominola

4.1. Introducción y motivaciones

Todos los días, millones de personas toman medicamentos que no les ayudan cuanto necesitan. Existe una heterogeneidad considerable en la forma en que los individuos responden a los medicamentos, en términos de eficacia y de seguridad. La variabilidad interindividual, debida tanto a factores genéticos como ambientales, provoca notables diferencias entre pacientes respecto a la absorción, el metabolismo, la excreción o el efecto sobre la diana terapéutica de un mismo fármaco.²³³⁻²³⁵ Por este motivo, la medicina personalizada o de precisión (la adaptación del tratamiento médico a las características individuales de cada paciente) está emergiendo, y con ella, los conceptos de dosificación "paciente-específica" (específica para cada paciente) o "a medida" surgen como una alternativa a la producción en masa de la industria farmacéutica tradicional, basada en el paradigma del "*one-size-fits-all*" a la hora de prescribir tratamientos.²³³

En este sentido, la impresión 3D ha demostrado ser una técnica de fabricación con gran potencial, ya que permite la creación de objetos tridimensionales, capa a capa, con total libertad de forma y diseño.²³⁶⁻²³⁸ De ese modo, se pueden imprimir dosis adaptadas a cada paciente sin costes adicionales, pues la simple modificación de la densidad de relleno o del tamaño de la figura, permite la adquisición de la dosis de fármaco deseada sin necesidad de reformular la tinta ni modificar el procedimiento de fabricación. A través de estas tecnologías de fabricación se pueden lograr, además, formas farmacéuticas de geometría compleja con perfiles alternativos de liberación y absorción de los medicamentos,²³⁹⁻²⁴² así como píldoras que contienen múltiples fármacos con perfiles definidos de liberación inmediata y sostenida.^{240,243-245} Estas multipíldoras permiten combinar distintos principios activos en una única toma, pudiendo mejorar así el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente y aumentando su calidad de vida.

Al igual que una impresora de inyección de tinta doméstica es capaz de imprimir múltiples archivos o páginas, una impresora 3D puede fabricar una variedad de productos de calidad en minutos. Esta capacidad de producción bajo demanda hace pensar en la posible aplicación de la impresión 3D para la fabricación de medicamentos en situaciones en las que el tiempo o los recursos son limitados, como en zonas de desastre o en determinadas

operaciones militares.^{237,246} Paralelamente, la impresión bajo demanda también permitiría al sector farmacéutico imprimir medicamentos de baja estabilidad para consumo inmediato, o abordar la producción de medicamentos huérfanos (destinados al diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades raras) que hasta la fecha no son viables debido a los costes de producción asociados.^{35,233} La posibilidad de trabajar con volúmenes reducidos, así como la eliminación de moldes y utillajes, disminuiría de manera clara la inversión inicial necesaria para lanzar la fabricación de un nuevo medicamento y reduciría las barreras a la experimentación durante el desarrollo de productos farmacéuticos (fabricación de pequeños lotes para su uso en ensayos clínicos, empleo de distintas combinaciones de excipientes...).

La evolución de la impresión 3D en el sector farmacéutico ha provocado que alguna de las organizaciones reguladoras principales, como la estadounidense Food and Drug Administration (FDA), elabore unas primeras directrices para normalizar esta tecnología emergente y ser así capaz también de proporcionar orientaciones claras y directas a las empresas que quieran apostar por su empleo.^{83,247,248} En esta línea, la FDA es la agencia pionera en la aprobación del primer medicamento fabricado mediante impresión 3D que se trasladó al mercado. En agosto de 2015, la compañía Aprecia Pharmaceuticals obtuvo el visto bueno para la comercialización de su producto Spritam®, basado en la tecnología patentada ZipDose®.^{249,250} Esta forma farmacéutica, capaz de contener hasta 1000mg de levetiracetam (un fármaco para el tratamiento de las convulsiones en adultos y niños con ciertos tipos de epilepsia), emplea la metodología de impresión 3D mediante proyección de aglutinante (Figura 4.1-1).



Figura 4.1-1. Procedimiento de fabricación ZipDose® (Aprecia Pharmaceuticals, LLC).

Así pues, Spritam® se obtiene a partir de la deposición sucesiva de capas de una mezcla de polvo (excipientes y principio activo) sobre la cual se deposita el líquido aglutinante de forma precisa y siguiendo un patrón, uniendo las partículas de polvo entre ellas y

preparándolas para adherir la siguiente capa de polvo que será depositada encima. Se forma así un comprimido sólido, altamente poroso y bucodispersable (se desintegra en cuestión de segundos al contacto con la saliva).²⁵¹ Sin embargo, aunque la creación de Spritam® supuso un posicionamiento de la impresión 3D en el sector farmacéutico, esta forma de dosificación no está destinada a la medicina personalizada y se aleja de unos de los propósitos que ofrece esta tecnología.

De forma reciente, la tecnología ZipDose® ha dejado de ser la única plataforma de fabricación de medicamentos mediante impresión 3D aprobada por la FDA después de que la empresa farmacéutica china Triastek haya obtenido también la autorización de la agencia reguladora para su tecnología, acuñada como Melt Extrusion Deposition (MED™), en febrero de 2021.²⁵²

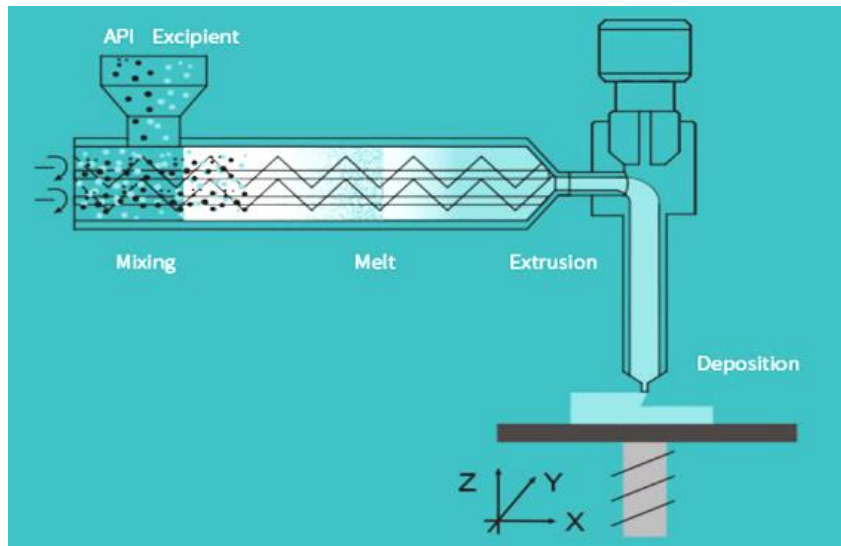


Figura 4.1-2. Tecnología de fabricación MED™ (Triastek, Inc.).

La impresión MED utiliza la deposición precisa, capa por capa, de la mezcla fundida de excipientes y principio(s) activo(s) para producir medicamentos con estructuras geométricas de elevada complejidad, dando lugar a un sistema de administración de fármacos cronoterapéuticos. El tratamiento de cronoterapia se basa en la idea de que la administración de principios activos en diferentes momentos del ciclo circadiano (el proceso interno natural del cuerpo que regula el sueño durante un período de 24 horas) maximiza el impacto terapéutico de un medicamento y minimiza los efectos secundarios. Según Triastek, su tableta T19, impresa en 3D con una forma y una estructura geométrica interna determinada, facilita el control preciso de la liberación del fármaco para lograr la

absorción necesitada por el paciente a lo largo del día. Tras su aprobación en Estados Unidos, Triastek planea solicitar la misma aprobación en China a finales de 2021, seguida de aplicaciones en Japón y Europa, previendo iniciar su comercialización a partir de 2023.²⁵³

Desde una perspectiva más académica, es conveniente remarcar que la mayoría de los trabajos publicados sobre personalización de dosis mediante impresión 3D responden a formulaciones orales sólidas que deben tragarse enteras, a excepción de un par de aproximaciones a las dosis masticables.^{254,255} Las formas farmacéuticas orales sólidas, aunque son ampliamente aceptadas por la sociedad, resultan inconvenientes para pacientes con dificultades para tragar o no cooperativos, como los niños o los ancianos. La falta de voluntad para tragar formas sólidas también es común en algunos adultos sanos, los cuales no lo comunican a los médicos por pudor, y el tratamiento termina fracasando sin haber podido considerar soluciones terapéuticas alternativas. En todos estos casos, el cumplimiento y la adherencia al tratamiento se ven directamente afectados, contribuyendo a una mayor ocurrencia de complicaciones médicas y disminuyendo la calidad de vida del paciente.²⁵⁶⁻²⁵⁸ Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente la falta de adherencia terapéutica provoca en España 18.000 muertes prematuras y tiene un coste para el Sistema Nacional de Salud de 11.250 millones de euros,²⁵⁹ suponiendo, por tanto, uno de los grandes retos a los que se enfrenta el sistema sanitario. En este sentido, la impresión 3D de medicamentos personalizados podría ayudar a paliar sustancialmente esta falta de cumplimiento gracias a su capacidad para la creación de multipíldoras, así como formas farmacéuticas más atractivas para ciertos grupos poblacionales, como la pediatría o la geriatría.

Por otro lado, existen medicamentos cuyas dosificaciones no están formuladas para su empleo directo en niños, motivo por el cual las formas de dosificación comerciales (comprimidos, cápsulas...) han de ser manipuladas mediante partición, trituración o disolución, antes de extraer una pequeña fracción que responda a la dosis prescrita para el paciente pediátrico. Sin embargo, se ha demostrado que esta manipulación puede conducir a la administración de dosis incorrectas e imprecisas en función de la formulación del comprimido que se manipule y de la praxis farmacéutica.²⁶⁰

Por este motivo, buscando proporcionar alternativas a las limitaciones mostradas, en el presente capítulo se recoge el desarrollo de unas gominolas medicamentosas impresas en 3D, acuñadas como “*drugmies*”: una fusión de los términos *drug* ‘fármaco’ y *gummies* ‘gominolas’, en inglés. Las *drugmies* son una forma de dosificación a medida del paciente,

con una apariencia llamativa y características organolépticas adecuadas, ideadas para mejorar la adherencia al tratamiento y reducir el impacto psicológico de la enfermedad, especialmente en niños.^{261–263}

4.2. Objetivos

Tradicionalmente, los niños son uno de los grupos de la población con mayor necesidad de dosis de fármaco adaptadas a su metabolismo y sus requerimientos (edad, peso, estado patológico...). En muchos casos, además, existe una ausencia de presentaciones comerciales de ciertos principios activos, de modo que la preparación del medicamento recae en la formulación magistral, lo cual conlleva posibles retrasos en el inicio o continuación del tratamiento. Paralelamente, estas fórmulas magistrales o preparados oficinales se preparan mayoritariamente como formas farmacéuticas líquidas (jarabes, suspensiones o emulsiones de distinta índole en función del principio activo). Habiendo observado que la mayoría de las nuevas formas farmacéuticas impresas por 3D son formas sólidas y no aptas para pediatría, y queriendo eliminar la imprecisión de dosis asociada a la administración de formas líquidas (cucharas de distintos volúmenes, error en las mediciones, falta de homogenización previa del jarabe), se ideó la fabricación de las *drugmies* como solución alternativa a toda esta problemática en la dosificación pediátrica actual.

Así pues, partiendo de estas premisas, se establecieron una serie de objetivos a abordar que serán descritos a lo largo del capítulo:

1. La creación de unidades posológicas con apariencia y textura de gominola.

Trabajar en la composición y los ingredientes para conseguir una fórmula, imprimible mediante SSE, que resultase suficientemente vistosa, agradable y apetecible. De ese modo, se pretende poder aumentar la adherencia al tratamiento por parte del paciente pediátrico y disminuir el impacto psicológico de la enfermedad.

2. La personalización dual del medicamento.

Lograr una personalización del medicamento desde dos vertientes:

- a. Obtener una dosis a medida en función del modelo 3D impreso, de su tamaño y del porcentaje de relleno de la figura.

- b. Permitir al paciente escoger formas y diseños (ositos, dinosaurios, corazones, etc...) aprovechando la versatilidad y la libertad de diseño inherente a la impresión 3D.

3. Obtención de una fórmula capaz de vehicular un principio activo para dosificación mediante impresión 3D.

Validar la aptitud de la composición para ser impresa en 3D, y para contener y dosificar un principio activo sin afectar a su integridad química.

4. Validación de la tecnología de fabricación.

Realización de ensayos comunes en la industria farmacéutica que aseguren la correcta fabricación de las unidades posológicas y faciliten la futura aprobación del equipamiento y del proceso de fabricación.

4.3. Selección de componentes y obtención de la fórmula base

Para desarrollar unidades posológicas personalizadas en forma de gominola o *drugmies*, era preciso formular unas tintas con una serie de requisitos:

- b) Un carácter semisólido y marcadas propiedades termorreversibles que permitieran, por un lado, su empleo en la impresora 3D tipo SSE y, por el otro, una correcta manipulación de las figuras una vez impresas y frías, sin necesidad de etapas de postprocesado que ralenticen o dificulten el proceso de fabricación.
- c) Unas propiedades reológicas adecuadas al proceso de impresión 3D, pues es un factor clave para crear figuras con geometrías y volúmenes precisos.
- d) Buenas características organolépticas (aspecto, tacto, aroma...), para que las dosis impresas resultasen atractivas y apetecibles a los ojos de un grupo poblacional muy exigente, como son los niños.

4.3.1. Descripción de los materiales seleccionados

En base a las premisas anteriores, se seleccionaron distintos hidrocoloides y agentes gelificantes comunes que pudieran cumplir con los requisitos y con la tipología de producto final que se pretendía obtener.^{131,264–266}

La información principal de los componentes se detalla a continuación, a excepción de aquella relativa al empleo de la gelatina y la goma xantana, que ya han sido recogidos en capítulos anteriores (secciones 2.3.1 y 3.3.1, respectivamente).

Almidón

El almidón es un carbohidrato polimérico compuesto por una gran cantidad de unidades de glucosa conectadas por enlaces glicosídicos, para dar lugar a sus dos macromoléculas principales: la amilosa, un polímero lineal con cadenas de glucosa $\alpha(1-4)$, y la amilopectina, con una estructura altamente ramificada de glucosas unidas mediante enlaces glicosídicos $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$.^{267–269} Producido por la mayoría de las plantas verdes para el

almacenamiento de energía, se empaqueta en forma de gránulos constituidos por regiones amorfas y semicristalinas.

El almidón se procesa generalmente por calentamiento en presencia de agua, produciéndose el hinchamiento y la transformación de los gránulos de almidón de un estado ordenado a desordenado, y la consecuente exudación de los componentes moleculares hasta la disrupción total de los gránulos, un fenómeno conocido como gelatinización. Para que la transición tenga lugar se requiere un porcentaje de agua mayor al 30% y una temperatura entre 60 y 85 °C, en función de la fuente de origen del almidón.^{269–271}

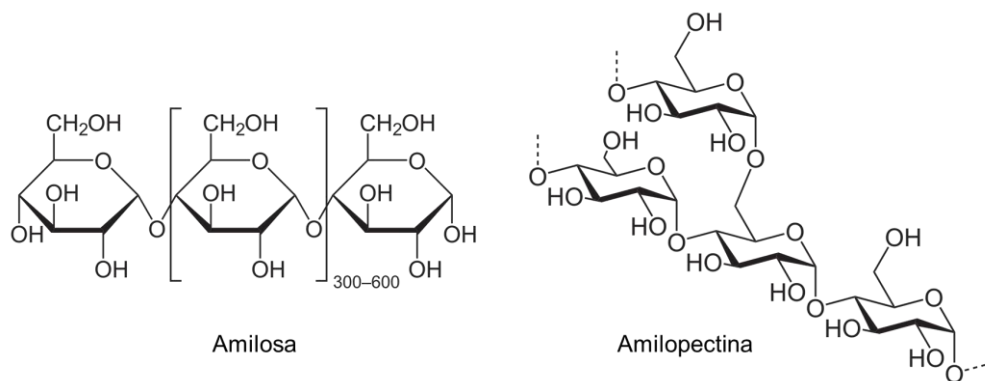


Figura 4.3-1. Estructuras de las moléculas de amilosa y amilopectina. (CC BY-SA 4.0, vía Wikimedia Commons).

La temperatura de gelificación es aquella a la que la viscosidad comienza a aumentar durante el proceso de calentamiento. Una alta temperatura de gelificación de los almidones indica una mayor resistencia al hinchamiento y a la rotura de los gránulos.²⁷²

El almidón se emplea en la industria alimentaria y farmacéutica con múltiples propósitos: como agente espesante, gelificante, aglutinante, diluyente o estabilizante.^{268,273,274} Dentro de la impresión 3D, se ha utilizado mayoritariamente para mejorar la reología y la imprimibilidad de purés vegetales, pastas proteicas o zumos en trabajos con alimentos,^{67,128,275} y también como plastificante en la fabricación de filamentos para su empleo en FDM.^{276,277} Por su accesibilidad y su bajo coste, en esta Tesis se ha utilizado, concretamente, almidón de maíz comercial.

Carragenato iota

La familia de los carragenanos abarca una serie de polímeros de galactosa, polianiónicos y estructuralmente similares, que son extraídos de algunas familias de algas rojas. Estos polisacáridos naturales existen en tres formas principales llamadas kappa (κ -), iota (ι -) o

lambda (λ -), en función del número (uno, dos o tres) de grupos sulfato que contienen por unidad repetida de disacárido, respectivamente.²⁷⁰ Concretamente, el ι -carragenato está formado por unidades alternas de galactosa con un grupo sulfato en el carbono 4 y de anhidrogalactosa con un grupo sulfato en el carbono 2 (Figura 4.3-2). Su solubilidad depende de diversos factores, como la temperatura, el pH o la presencia de otros solutos. Por ejemplo, las sales sódicas de kappa e iota son solubles en agua fría, aunque las sales de potasio no lo son. Los carragenatos son insolubles en disolventes orgánicos, como etanol y éter, y en aceite.²⁷⁸

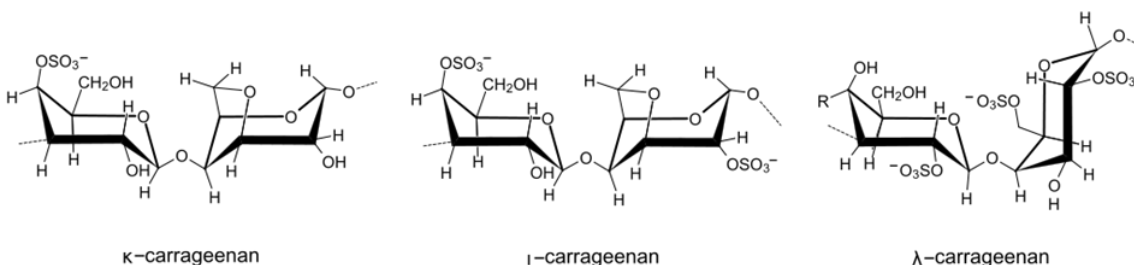


Figura 4.3-2. Estructuras de los carragenatos kappa, iota y lambda. (CC BY-SA 4.0, vía Wikimedia Commons).

Kappa y iota, con capacidad para formar geles termorreversibles en presencia de cationes, son ampliamente utilizados en las industrias alimentaria y farmacéutica como agentes espesantes o estabilizantes. Concretamente, el ι -carragenato forma, en presencia de iones calcio, geles elásticos, sin tendencia a la sinéresis y que resisten la congelación.²⁷⁹

El proceso de gelificación de los carragenatos mayormente aceptado supone que, en solución y a alta temperatura, las cadenas de galactanos se disponen de forma aleatoria, mientras que, si la temperatura se reduce, se induce la formación de hélices dobles a través de puentes de hidrógeno.²⁷⁸ Paralelamente, si se incorporan cationes a la solución, se neutralizan las cargas de los grupos sulfato que hacen que las hélices se repelan, provocando así que se agreguen generando la reticulación (Figura 4.3-3). La formación de esta estructura cuaternaria contribuye a las propiedades reológicas y mecánicas de los geles resultantes.^{264,280-282}

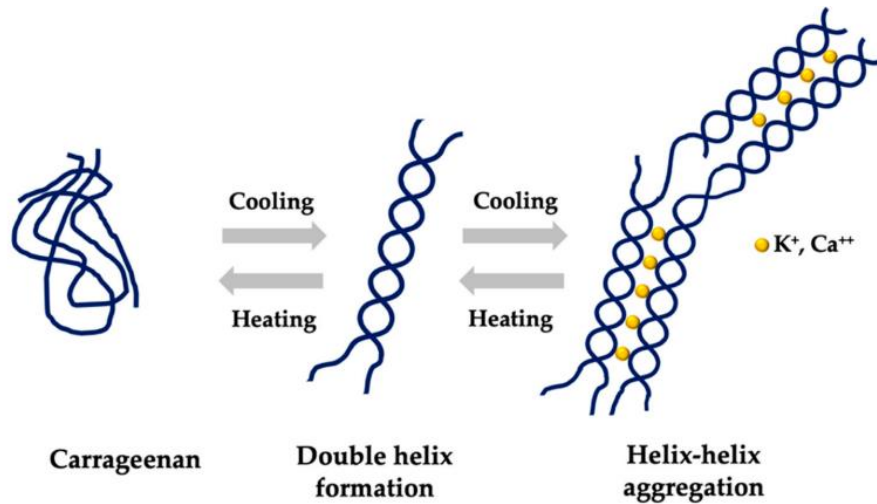


Figura 4.3-3. Mecanismo de gelificación de los carragenatos. Extraído de (Pacheco-Quito et al., 2020).

4.3.2. Experimento factorial completo: obtención de la fórmula base

Una vez seleccionados los materiales a emplear, se realizó un experimento factorial para encontrar la combinación (o combinaciones) con mejores resultados.

En estadística, un experimento factorial completo es un experimento cuyo diseño consta de dos o más factores, cada uno con distintos valores o niveles a su vez, cuyas unidades experimentales cubren todas las posibles combinaciones de esos niveles en todos los factores. Este tipo de experimentos permiten el estudio del efecto de cada factor sobre la variable respuesta, así como el efecto de las interacciones entre factores sobre dicha variable. En este caso, se realizó un diseño factorial 2^4 , donde cada factor es un hidrocoloide distinto con dos niveles posibles (Tabla 4.3-1).

Tabla 4.3-1. Concentraciones de carragenato iota, almidón de patata y gelatina porcina utilizando un diseño factorial de 2^4 .

Factor	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (+1)
Carragenato iota (%p/p)	0,0	2,0
Almidón de maíz (%p/p)	5,0	8,0
Gelatina tipo A (%p/p)	5,0	8,0
Goma xantana (%p/p)	0,25	0,50

De la combinación de factores y niveles, se obtuvieron los 16 ensayos siguientes, con las consecuentes formulaciones a testear (Tabla 4.3-2). Se prepararon 30 g de cada fórmula, empleando la cantidad de agua purificada suficiente en cada caso hasta completar la masa final. La Tabla 4.3-3. recopila los detalles de los materiales empleados.

Tabla 4.3-2. Diseño de la matriz experimental para las variables independientes carragenato iota, almidón de maíz, gelatina tipo A y goma xantana (%p/p).

Ensayo	Valores	Carragenato iota	Almidón de maíz	Gelatina	Goma xantana	Código fórmula
1	(-1, -1, -1, -1)	0,0	5,0	5,0	0,25	CAGX05525
2	(-1, -1, -1, +1)	0,0	5,0	5,0	0,50	CAGX05550
3	(-1, -1, +1, -1)	0,0	5,0	8,0	0,25	CAGX05825
4	(-1, -1, +1, +1)	0,0	5,0	8,0	0,50	CAGX05850
5	(-1, +1, -1, -1)	0,0	8,0	5,0	0,25	CAGX08525
6	(-1, +1, -1, +1)	0,0	8,0	5,0	0,50	CAGX08550
7	(-1, +1, +1, -1)	0,0	8,0	8,0	0,25	CAGX08825
8	(-1, +1, +1, +1)	0,0	8,0	8,0	0,50	CAGX08850
9	(+1, -1, -1, -1)	2,0	5,0	5,0	0,25	CAGX25525
10	(+1, -1, -1, +1)	2,0	5,0	5,0	0,50	CAGX25550
11	(+1, -1, +1, -1)	2,0	5,0	8,0	0,25	CAGX25825
12	(+1, -1, +1, +1)	2,0	5,0	8,0	0,50	CAGX25850
13	(+1, +1, -1, -1)	2,0	8,0	5,0	0,25	CAGX28525
14	(+1, +1, -1, +1)	2,0	8,0	5,0	0,50	CAGX28550
15	(+1, +1, +1, -1)	2,0	8,0	8,0	0,25	CAGX28825
16	(+1, +1, +1, +1)	2,0	8,0	8,0	0,50	CAGX28850

Tabla 4.3-3. Materiales empleados para las fórmulas base.

Componente	Nombre comercial	Distribuidor
Carragenato iota	Gelificación Iota®	Guzmán Gastronomía SL
Goma xantana	-	Fagron Iberica SAU
Gelatina tipo A	Gelatina porcina tipo A	Sigma-Aldrich Química SL
Almidón de maíz	Maizena®	Unilever España SA
Agua purificada	-	Fagron Iberica SAU

Protocolo de formulación

1. En primer lugar, se pesa la cantidad de gelatina correspondiente y se le añade la mitad de la masa de agua total, para hidratarla durante unos 15 minutos. Pasado ese tiempo, se calienta la gelatina hidratada en un baño a 40 ± 2 °C para que se funda.
2. En otro recipiente, se pesa el almidón de maíz y se disuelve en la cantidad de agua restante.
3. En un tercer recipiente, se pesa la cantidad de goma xantana y se añade, si corresponde, la cantidad de carragenato. Seguidamente, se incorpora paulatinamente la suspensión de almidón de la etapa (2), mientras se mezcla, de forma lenta y manual, hasta obtener una pasta homogénea.
4. Se añade la gelatina hidratada de la etapa (1) a la mezcla homogénea de la etapa (3) para obtener la mezcla final de ingredientes.
5. Se mantiene la fórmula en un baño a 60 ± 2 °C durante 30-45 minutos para obtener la tinta preliminar para la realización de los ensayos.

Pruebas de impresión y resultados

Con el propósito de validar de forma rápida la aptitud de las tintas preliminares, se realizaron pruebas de impresión de un modelo 3D sencillo. De ese modo, se seleccionó un disco de 15 mm de diámetro y 4,5 mm de altura (Figura 4.3-4A).

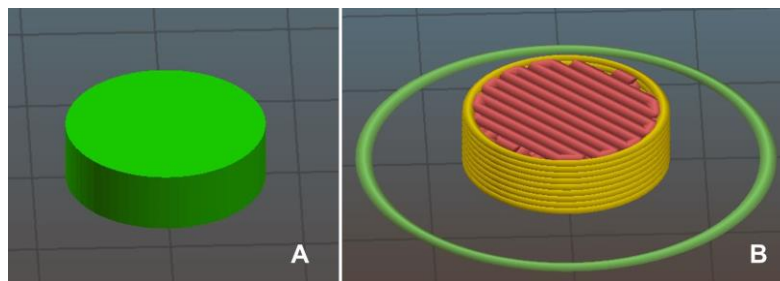


Figura 4.3-4. Previsualización del disco 3D seleccionado (A) y de la pieza laminada conforme a los parámetros de impresión fijados.

Además del mismo modelo 3D, también se emplearon parámetros de impresión idénticos para todos los ensayos, de modo que no hubiera sesgos en el aspecto de la pieza final derivado de estos. La Tabla 4.3-4 recopila los parámetros de impresión principales establecidos para las pruebas de impresión.

Tabla 4.3-4. Parámetros de impresión.

Diámetro de boquilla: 0,84 mm	Densidad de relleno: 70%
Altura de capa: 0,5 mm	Patrón de relleno: rectilíneo
Número de perímetros: 1	Ángulo de relleno: 45°
Velocidad de impresión: 10 mm/s	Capas sólidas: 1 <i>bottom</i> , 1 <i>top</i>

Para evaluar las distintas mezclas, se imprimieron discos a temperatura ambiente y a una temperatura programada de 35 °C. La Tabla 4.3-5 recopila la evaluación, para cada fórmula, de los aspectos siguientes:

- **Sinéresis:** se observa separación de fases en la fórmula.
- **Apariencia:** qué forma tiene el producto impreso.
- **Delaminación:** se produce separación de las capas que constituyen la figura.
- **Manipulabilidad:** las figuras se pueden coger y tocar sin mostrar deterioro.

Las fórmulas se valoraron como “apta” o “no apta” siguiendo el diagrama de la Figura 4.3-5.

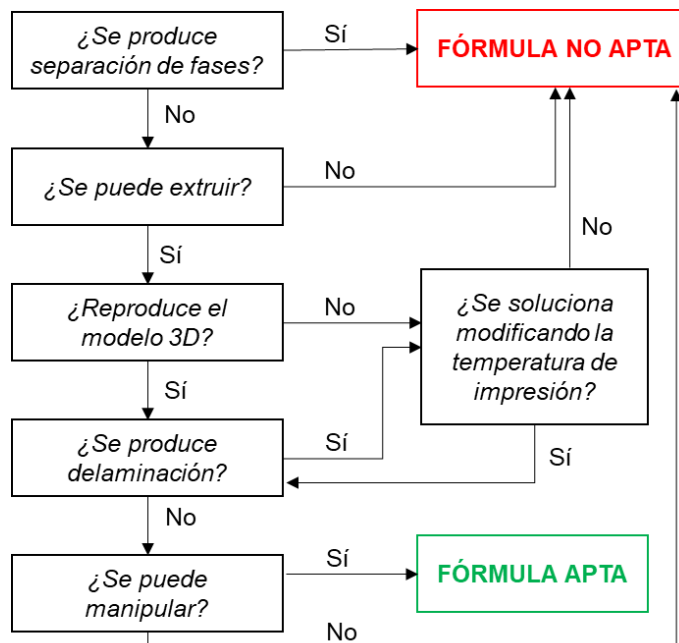


Figura 4.3-5. Diagrama de selección de tintas.

Tabla 4.3-5. Recopilación de resultados de las pruebas de impresión de las tintas.

	Código	Temperatura ambiente (25 °C)				Temperatura programada (35 °C)				Evaluación APTA/NO APTA
		<u>Sinéresis</u>	<u>Apariencia</u>	<u>Delaminación</u>	<u>Manipulabilidad</u>	<u>Sinéresis</u>	<u>Apariencia</u>	<u>Delaminación</u>	<u>Manipulabilidad</u>	
Tinta 1	CAGX05525	Sí	Huevo	No	No	NP	NP	NP	NP	NO APTA
Tinta 2	CAGX05550	Sí	Huevo	No	No	NP	NP	NP	NP	NO APTA
Tinta 3	CAGX05825	No	Tronco de cono	No	Sí	No	Iglú	No	Sí	NO APTA
Tinta 4	CAGX05850	No	Tronco de cono	No	Sí	No	Iglú	No	Sí	NO APTA
Tinta 5	CAGX08525	Sí	Huevo	No	No	NP	NP	NP	NP	NO APTA
Tinta 6	CAGX08550	Sí	Huevo	No	No	NP	NP	NP	NP	NO APTA
Tinta 7	CAGX08825	No	Tronco de cono	No	Sí	No	Iglú	No	Sí	NO APTA
Tinta 8	CAGX08850	No	Disco*	No	Sí	No	Iglú	NP	NP	NO APTA
Tinta 9	CAGX25525	No	Disco	No	No	No	Disco	No	No	NO APTA
Tinta 10	CAGX25550	No	Disco	No	Media	No	Disco	No	Media	APTA
Tinta 11	CAGX25825	No	Disco	Sí	Sí	No	Disco	No	Sí	APTA**
Tinta 12	CAGX25850	No	Disco	Sí	Media	No	Disco	Sí	Sí	APTA
Tinta 13	CAGX28525	No	Disco	Sí	No	No	Disco	No	Sí	APTA
Tinta 14	CAGX28550	No	Disco	Sí	Media	No	Disco	No	Media	APTA
Tinta 15	CAGX28825	No	Disco*	Sí	No	No	Disco*	No	Sí	NO APTO
Tinta 16	CAGX28850	No	Disco*	Sí	No	No	Disco*	No	Sí	NO APTO

*Con defectos en la estructura o capas incompletas **Fórmula final seleccionada

NP: No Procede

Para la evaluación de las impresiones, los resultados se agruparon por similitud de comportamiento del fluido o de la figura obtenida:

- **GRUPO 1: tinta 1 (CAGX05525), tinta 2 (CAGX05550), tinta 5 (CAGX08525) y tinta 6 (CAGX08550).**

En estas cuatro combinaciones se produjo sinéresis o separación de fases. Se trata de formulaciones altamente inestables porque, al dejarlas en reposo, la mezcla se distribuyó en dos capas: un gel denso en la base y un sobrenadante acuoso. Paralelamente, el proceso de impresión magnificó este fenómeno, obteniéndose deposiciones sin ninguna consecución de forma ni manipulabilidad, motivo por el que fueron directamente descartadas y no se realizaron pruebas a temperatura programada. Cabe mencionar que la separación de fases fue más evidente en las tintas con mayor cantidad de goma xantana en su composición (CAGX05550 y CAGX08550) (Figura 4.3-6).

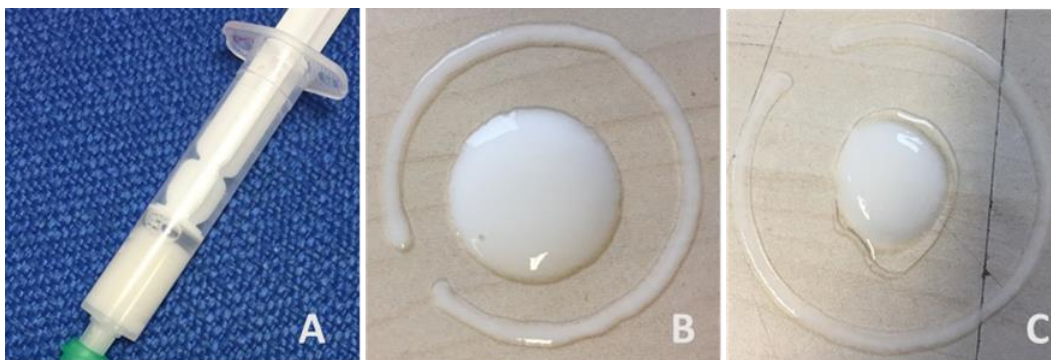


Figura 4.3-6. (A) Separación de fases en reposo. (B) Impresión con tinta 1 a 25 °C. (C) Impresión con tinta 2 a 25 °C.

La sinéresis en mezclas de biopolímeros es un fenómeno común. En este caso, al tratarse de mezclas proteína/polisacáridos, las interacciones entre moléculas suelen estar dominadas por fuerzas electrostáticas, como los enlaces de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals. Como consecuencia, las interacciones se pueden ajustar controlando el pH, la fuerza iónica o la relación proteína/polisacárido.^{167,283,284} Las cuatro mezclas en las que se produjo sinéresis tienen en común el hecho de contener una baja cantidad de gelatina, siendo probable que esta menor cantidad de proteína aboque a una inestabilidad en la fórmula que no se observa en el resto de las mezclas con mayor cantidad de gelatina. Por el contrario, esta separación de fases no se

observa en ninguna de las tintas que contienen carragenato iota (tintas 9-16), independientemente de la cantidad de gelatina que contengan. Este hecho puede ser debido a dos factores distintos: (i) al efecto sinérgico en la gelificación que se produce en las mezclas de gelatina y carragenato iota, que da lugar a sistemas más estables,¹⁷⁷ o (ii) a la disminución de la temperatura de gelificación que provoca el carragenato iota en las suspensiones de almidón,²⁸⁵ que deriva en un aumento el grado de gelatinización de este a una menor temperatura, también aportando estabilidad a la mezcla.

- **GRUPO 2: tinta 3 (CAGX05825), tinta 4 (CAGX05850), tinta 7 (CAGX08825) y tinta 8 (CAGX08850).**

Las tintas 3, 4 y 7 resultaron demasiado líquidas, tanto a 35 °C como a temperatura ambiente, no consiguiéndose una correcta ejecución del modelo tridimensional (Figura 4.3-7A). Si bien, hubo una clara mejora con la disminución de la temperatura (Figura 4.3-7B), debido principalmente a las propiedades termorreversibles de la gelatina (componente en valor *alto* en estas mezclas). En el caso de la tinta 8, a 35 °C se obtuvo una figura con típica forma de iglú. Sin embargo, a 25 °C mejoró la consecución de forma, probablemente por el aumento de la viscosidad de la tinta derivada de su mayor contenido de goma xantana. No obstante, se apreciaron trazos incompletos y defectos en la pieza, causados por un flujo irregular en la deposición de la tinta (Figura 4.3-7C).

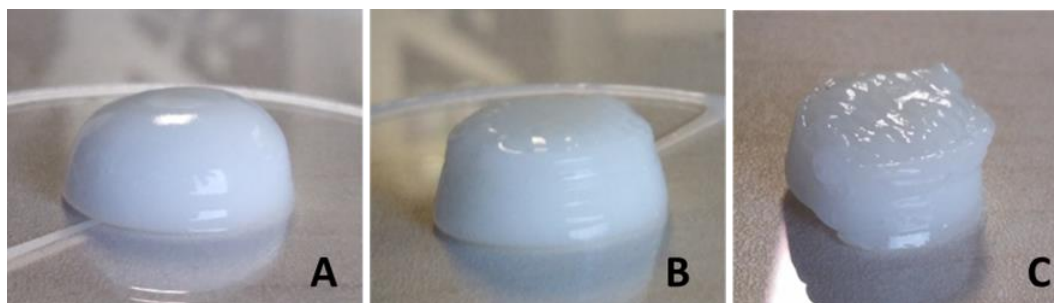


Figura 4.3-7. Ejemplo de formas iglú (A) y tronco de cono (B) obtenidas con tinta 7 a 35 °C y 25 °C, respectivamente. (C) Disco con defectos, obtenido con tinta 8 a 35 °C.

- **GRUPO 3: tinta 9 (CAGX25525), tinta 10 (CAGX25550), tinta 13 (CAGX28550) y tinta 14 (CAGX28550)**

Las figuras obtenidas con la tinta 9 resultaron no manipulables, con un marcado hundimiento del centro de la pieza en ambas temperaturas. Por su parte, la tinta 10, reprodujo perfectamente la figura, sin apenas hundimiento o defectos en los trazos

(Figura 4.3-8). En frío se pudo manipular, aunque resultó ligeramente pegajosa al tacto, lo cual podría solventarse con una mayor proporción de gelatina que aportase un punto más de termorreversibilidad y un mejor tacto.

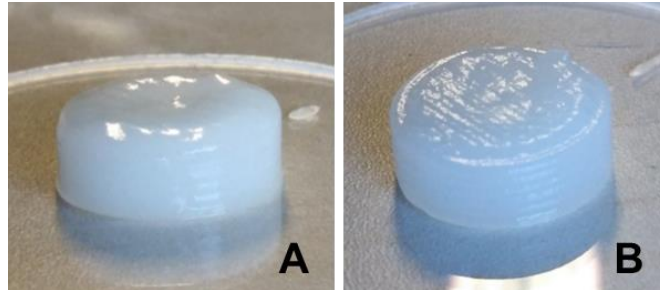


Figura 4.3-8. Impresiones a temperatura ambiente con tinta 9 (A) y tinta 10 (B).

Paralelamente, las tintas 13 y 14 reprodujeron con bastante fidelidad la figura a temperatura ambiente, pero se produjo delaminación al intentar manipularlas. Para intentar mejorar los problemas de delaminación y pérdida de la resistencia en la dirección Z de las pastillas, se realizaron impresiones amentando la temperatura del extrusor a 35 °C. En cuanto al aspecto de las capas, aunque todavía se podían apreciar los trazos, éstas no se separaban con tanta facilidad y se obtuvo una figura con mayor rigidez. Sin embargo, el aumento de temperatura produjo hundimiento de la pieza en la parte central, al no enfriar lo suficientemente rápido y recuperar rigidez antes de que se depositase la siguiente capa.

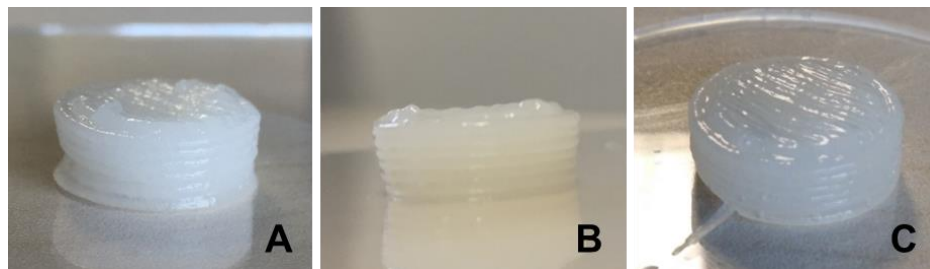


Figura 4.3-9. Impresión con tinta 13 a temperatura ambiente (A) y a 35 °C (B). Impresión con tinta 14 a 35 °C (C).

Del mismo modo que sucedió con las tintas 9 y 10, a mayor cantidad de goma xantana, menor es el hundimiento del centro. La goma xantana da lugar a fluidos muy pseudoplásticos, que recuperan rápido la viscosidad una vez cesa el esfuerzo sobre ella y de forma independiente a la temperatura.^{125,167,220}

- **GRUPO 4: tinta 11(CAGX25825) y tinta 12 (CAGX25850)**

Los resultados de la tinta 11 fueron los más favorables. Se imprimieron sin dificultad y con una buena ejecución de forma tanto a temperatura ambiente como a 35 °C. Sin embargo, como en casos anteriores, las capas impresas a mayor temperatura estaban mejor unidas y el aspecto final de la figura era más brillante y homogéneo (Figura 4.3-10B). Resultaron manipulables, elásticas y agradables al tacto.

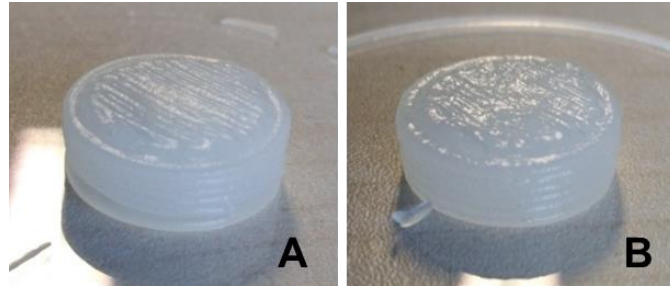


Figura 4.3-10. Impresiones con tinta 11 a temperatura ambiente (A) y a 35 °C (B).

Por su lado, la tinta 12 también proporcionó impresiones correctas, pero el fluido era más viscoso que el anterior, por un mayor contenido de goma xantana. Con el aumento de la temperatura del extrusor, se obtuvieron trazos más lisos y brillantes y figuras manipulables y con un tacto apropiado.

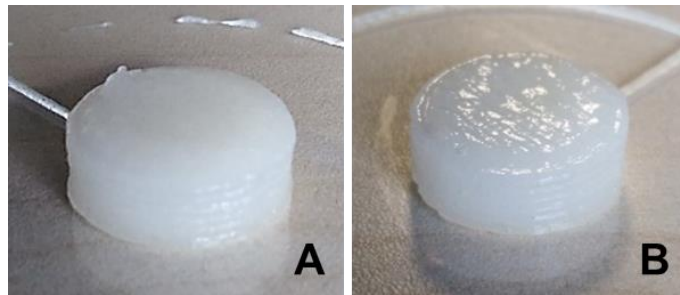


Figura 4.3-11. Figuras impresas a temperatura ambiente y a 35 °C con tinta 12.

- **GRUPO 5: Tinta 15 (CAGX28825) y Tinta 16 (CAGX28850)**

Estas tintas resultaron muy densas incluso a temperaturas altas (60-70 °C), lo cual dificultó su introducción en los cartuchos o jeringuillas para usar en la impresora.

A temperatura ambiente, los geles se fracturaron al ser extruidos por la boquilla, dando un aspecto grumoso a la figura y restando manipulabilidad (Figura 4.3-12B). A 35 °C, se obtuvieron piezas más brillantes y manipulables, pero con defectos importantes en

las capas derivados de la alta viscosidad de ambas tintas, que interfiere en la correcta deposición de los trazos (Figura 4.3-12A, C).

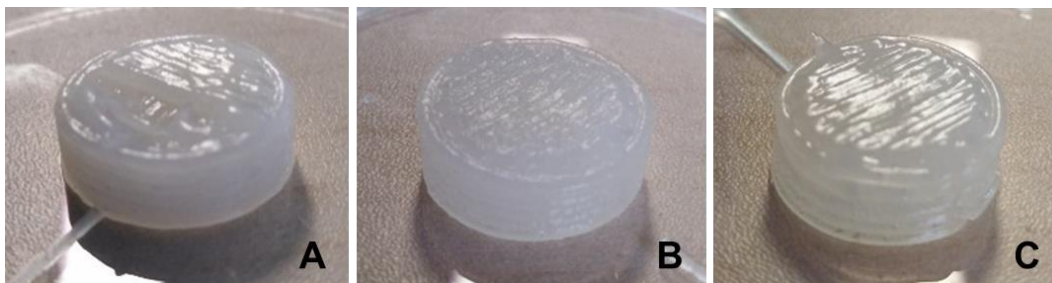


Figura 4.3-12. Impresiones con tinta 15 a 35 °C (A). Impresiones con tinta 16 a temperatura ambiente (B) y a 35 °C (C).

De toda esta batería de ensayos se concluye que, por lo general, las fórmulas con carragenato iota en la composición dieron mejor resultado que aquellas que no lo contenían. Dentro de las fórmulas con carragenato iota (tintas 9 a 16), a excepción de 15 y 16 que resultaron demasiado espesas y daban problemas en el envasado y en la consecución de forma, el resto fueron relativamente aptas para imprimir, aunque no todas igual de manipulables. Las tintas 11 y 12 resultaron las más convenientes, sobre todo bajo temperatura controlada (35 °C). Finalmente, se seleccionó la tinta 11 como fórmula base sobre la que trabajar por ser la más manipulable, fácil de imprimir y de formular (menor cantidad de goma xantana).

4.3.3. Selección del principio activo: clorhidrato de ranitidina

Para la elaboración de las *drugmies*, el principio activo seleccionado fue el clorhidrato de (E)-N-[2-[[[5-[(dimetilamino)metil]-2-furanyl]metil]tio]etil]-N-metil-2-nitro-1,1-etendiamina o clorhidrato de ranitidina. La ranitidina es un API antagonista del receptor de H₂ de la histamina (H₂RA) de las células parietales del estómago, que inhibe la secreción de ácido gástrico, reduciendo así el volumen del contenido gástrico y aumentando el pH intragástrico.^{286,287} Químicamente, su estructura contiene un anillo heterocíclico de furano, e incluye varios grupos funcionales: un sulfuro, una amina terciaria y dos enaminas secundarias, junto con un grupo nitro y un doble enlace con configuración E.

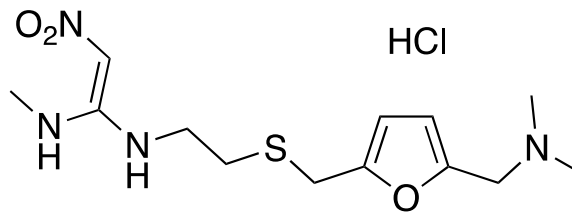


Figura 4.3-13. Estructura del clorhidrato de ranitidina.

El fármaco exhibe polimorfismo y se conoce que existe en dos estados cristalinos, denominados *Forma 1* y *Forma 2*, aunque la biodisponibilidad y la eficacia terapéutica de ambas formas son equivalentes.^{288,289} Es un polvo de color blanco a amarillo pálido, con un olor característico, y un sabor ácido y amargo. Es muy soluble en agua, metanol y ácido clorhídrico diluido. Una solución acuosa al 1 % tiene un pH 4,5 – 6,0.

La ranitidina es un tratamiento de primera línea para la úlcera péptica y el reflujo gastroesofágico en niños por vía oral, con una dosis altamente variable según la edad, el peso y el estado clínico del paciente (Tabla 4.3-6). A su vez, los pacientes con insuficiencia renal requieren un ajuste de la dosis (50 – 75% de la dosis habitual) en función de la gravedad de su afección, puesto que el fármaco se excreta por esta vía y los niveles plasmáticos se incrementan en exceso.²⁹⁰

Tabla 4.3-6. Dosis y pauta de administración oral del clorhidrato de ranitidina.

Patología	Dosis y pautas* (1-16 Años)
Úlcera gastroduodenal	<u>Tratamiento:</u> 4-8 mg/kg/día en 2 dosis, máx. 300 mg/día.
	<u>Mantenimiento:</u> 2-4 mg/kg/día en dosis única, máx. 150 mg/día.
Reflujo gastroesofágico	4-10 mg/kg/día en 2 dosis, máx. 300 mg/día.

*Datos: Asociación Española de Pediatría (AEP).

Algunos países europeos tienen un medicamento específico para niños, comúnmente un jarabe que contiene 15 mg/ml de ranitidina.²⁹¹ En España, en cambio, el jarabe de ranitidina es una fórmula oficial, un producto elaborado en la farmacia siguiendo las prescripciones de la farmacopea.²⁹² Esta preparación *ad hoc* conlleva un retraso en el inicio del tratamiento derivado del propio proceso de elaboración y dispensación de la fórmula. Además, y tal y como ha sido reflejado previamente en esta memoria, la dosificación de líquidos orales se ha realizado tradicionalmente con vasos dosificadores calibrados,

cucharas dosificadoras o jeringas que, si bien son una solución económica, se han asociado con errores humanos que comprometen la dosificación adecuada y la seguridad del paciente.^{293,294}

La alta variabilidad en cuanto a su dosificación, unida a la ausencia de presentaciones comerciales aptas para la población pediátrica y al riesgo de infra o sobredosificación asociado al uso de formas líquidas como los jarabes, hacen de la ranitidina el principio activo perfecto para ser dosificado en forma de *drugmies*.

4.3.4. Adición de excipientes auxiliares y protocolo final de formulación: obtención de las tintas F1-F4

Para mejorar las características organolépticas de la tinta base, se añadieron a la fórmula una serie de excipientes auxiliares:

- **Aroma:** en la preparación de fórmulas pediátricas es bastante común el uso de esencias frutales para enmascarar otros olores y facilitar la ingesta de medicamento. Se escogió la esencia de fresa por ser uno de los aromas más populares y con mayor aceptación entre los niños.
- **Sabor:** para enmascarar el sabor amargo de la ranitidina y endulzar la fórmula de forma similar a una gominola, se sustituyó parte del agua de la fórmula base (1g) por edulcorante de mesa líquido a base de sacarina y ciclamato sódico (Edulcorante líquido, Hacendado). Se optó por los edulcorantes químicos en lugar de por el jarabe de glucosa para evitar la ingesta elevada de azúcar en los niños y por su menor aporte calórico.
- **Color:** se emplearon colorantes alimentarios hidrosolubles comerciales (Vahiné Colorantes Alimentarios, McCormik España S.A.). Se emplearon indistintamente los tres colores: rojo (azorrubina, E122), amarillo (tartrazina, E102) y azul (azul brillante, E133).

Los excipientes auxiliares fueron incorporados a la fórmula en una etapa al final del proceso de mezcla, dando lugar al protocolo de formulación final que se describe a continuación (Figura 4.3-14).

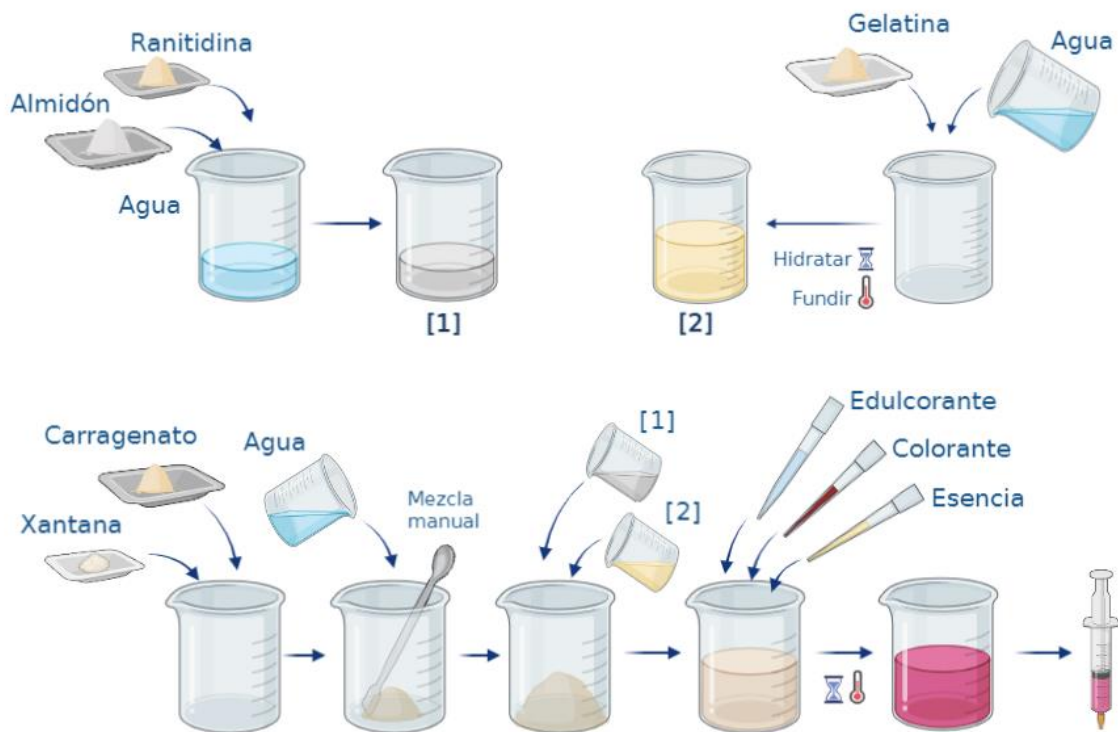


Figura 4.3-14. Esquema del protocolo final de formulación de las tintas farmacéuticas.

Protocolo de final de formulación

1. En primer lugar, se pesa la cantidad de gelatina correspondiente y se le añade la mitad de la masa de agua total, para hidratarla durante unos 15 minutos. Pasado ese tiempo, la gelatina hidratada se calienta en un baño a 40 ± 2 °C para que se funda.
2. En otro recipiente, se pesa la cantidad de ranitidina y el almidón de maíz, según proceda, y se disuelven en la cantidad de agua restante.
3. En un tercer recipiente, se pesa la cantidad de goma xantana y de carragenato iota. Se incorpora paulatinamente la suspensión de almidón y/o ranitidina de la etapa (2) mientras se mezcla, de forma lenta y manual para evitar la introducción de aire a la fórmula, hasta obtener una pasta homogénea (Figura 4.3-15).



Figura 4.3-15. Aspecto de la mezcla carragenato iota – almidón de maíz – goma xantana.

4. Se incorpora la gelatina hidratada de la etapa (1) a la mezcla homogénea de la etapa (3) para obtener una pasta densa, brillante y sin grumos (Figura 4.3-16).



Figura 4.3-16. Aspecto de la fórmula tras la incorporación de la gelatina.

5. Se añade a la mezcla de la etapa (4) la cantidad de esencia, colorante y edulcorante correspondiente agitando con suavidad para evitar la incorporación de aire.
6. Se mantiene en un baño a 60 ± 2 °C durante 30-45 minutos para obtener la tinta preliminar para la realización de los ensayos. En el caso de las tintas con almidón en su composición, se mantiene a 70 ± 2 °C durante al menos 60 minutos, para que se produzca la gelificación de este.

En un intento de prescindir de la etapa de gelificación del almidón, para evitar tener que someter al API a una temperatura más alta durante un periodo de tiempo mayor que pudiera comprometer su estabilidad, se realizaron pruebas de formulación con la tinta base seleccionada (Tinta 11) suprimiendo el contenido en almidón. Se detectó que la mezcla también era imprimible sin este componente y que, además, con ella se obtenían figuras

con una apariencia distinta (mayor transparencia). De ese modo, se optó por diseñar una última matriz experimental (Tabla 4.3-7) y preparar cuatro tintas finales mediante las cuales poder observar tanto el papel de la ranitidina, como el del almidón de maíz en la composición y en los medicamentos impresos. La Tabla 4.3-8 muestra la composición detallada para cada una de las fórmulas finales estudiadas.

Tabla 4.3-7. Matriz experimental para la generación de las tintas F1 – F4.

Formula	Código	Ranitidina HCl (%p/p)	Almidón de maíz (%p/p)
F1	R(-)CS(+)	0,00	5,00
F2	R(+)CS(+)	3,35	5,00
F3	R(-)CS(-)	0,00	0,00
F4	R(+)CS(-)	3,35	0,00

Tabla 4.3-8. Composición detallada de las fórmulas F1 – F4.

	F1	F2	F3	F4
	R(-)CS(+)	R(+)CS(+)	R(-)CS(-)	R(+)CS(-)
Ranitidina HCl (g)	0,000	1,004	0,000	1,004
Almidón de maíz (g)	1,500	1,500	0,000	0,000
Carragenato iota (g)	0,600	0,600	0,600	0,600
Goma xantana (g)	0,075	0,075	0,075	0,075
Gelatina tipo A (g)	2,400	2,400	2,400	2,400
Edulcorante líquido (g)	1,000	1,000	1,000	1,000
Esencia de fresa (g)	0,150	0,150	0,150	0,150
Colorante alimentario (g)	0,150	0,150	0,150	0,150
Agua purificada	qsp 30g	qsp 30g	qsp 30g	qsp 30g

En los códigos que identifican cada fórmula, R= ranitidina, CS= almidón de maíz.

Una vez formuladas, se procedió a la realización de un análisis reológico completo de las cuatro tintas para poder valorar en profundidad los efectos de la adición de principio activo y la imprimibilidad de las composiciones.

4.4. Análisis reológico de las tintas farmacéuticas

4.4.1. Materiales y métodos

Las tintas se atemperaron en un baño a 30 °C durante al menos 30 minutos, previamente a la medición, para fluidificarlas y poder depositarlas entre las placas del reómetro sin dañar excesivamente la estructura interna de la muestra y evitando la incorporación accidental de aire. Se utilizaron espátulas de plástico para cargar un volumen de muestra aproximadamente de 0,5 ml por ensayo. Las muestras se descartaron después de cada prueba. Con el objeto de asegurar el mismo grado de relajación estructural y una temperatura correcta y uniforme en la muestra, todos los ensayos estuvieron precedidos de un tiempo de equilibrado de 60 segundos.

Las curvas de flujo se realizaron aumentando la velocidad de corte de forma constante desde 0,1 hasta 100 s⁻¹ en 120 s. El ensayo se llevó a cabo a dos temperaturas: 23 °C y 37 °C. Paralelamente, los datos del reograma se ajustaron a distintos modelos matemáticos empleando el propio software de visualización de datos del reómetro.

La tixotropía se midió mediante un ensayo SFM, aplicando una velocidad de corte de 0,4 s⁻¹ durante 120 s en la primera y en la última etapa, mientras que en la etapa central se aplicó una velocidad de cizallamiento de 100 s⁻¹ durante 40 s. La regeneración estructural se determinó como el porcentaje de la viscosidad obtenida después de la aplicación de la segunda etapa, con respecto a la viscosidad media obtenida en los 40 últimos segundos de la primera etapa, donde la viscosidad consigue su valor en equilibrio.

El comportamiento viscoelástico se estudió a través de los ensayos SAOS básicos. Primero, un barrido de esfuerzo con un intervalo de deformación de 0,1 a 100% y a una frecuencia fija de 1 Hz, para la determinación de la LVR. Finalmente, un barrido de frecuencia de 0,1 a 10 rad/s a una deformación fija dentro de la LVR, para asegurar que la prueba se realiza sin perturbar la estructura de la muestra.

4.4.2. Resultados

4.4.2.1. Curvas de flujo

Realizando un análisis cualitativo de los perfiles de viscosidad (μ) y esfuerzo cortante (τ) respecto a la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$) (Figura 4.4-1), todas las tintas presentaron carácter termosensible, pues su viscosidad disminuyó con el aumento de temperatura de 23 °C a 37 °C, aunque fue ligeramente menor en las tintas con ranitidina en su composición (F2 y F4).

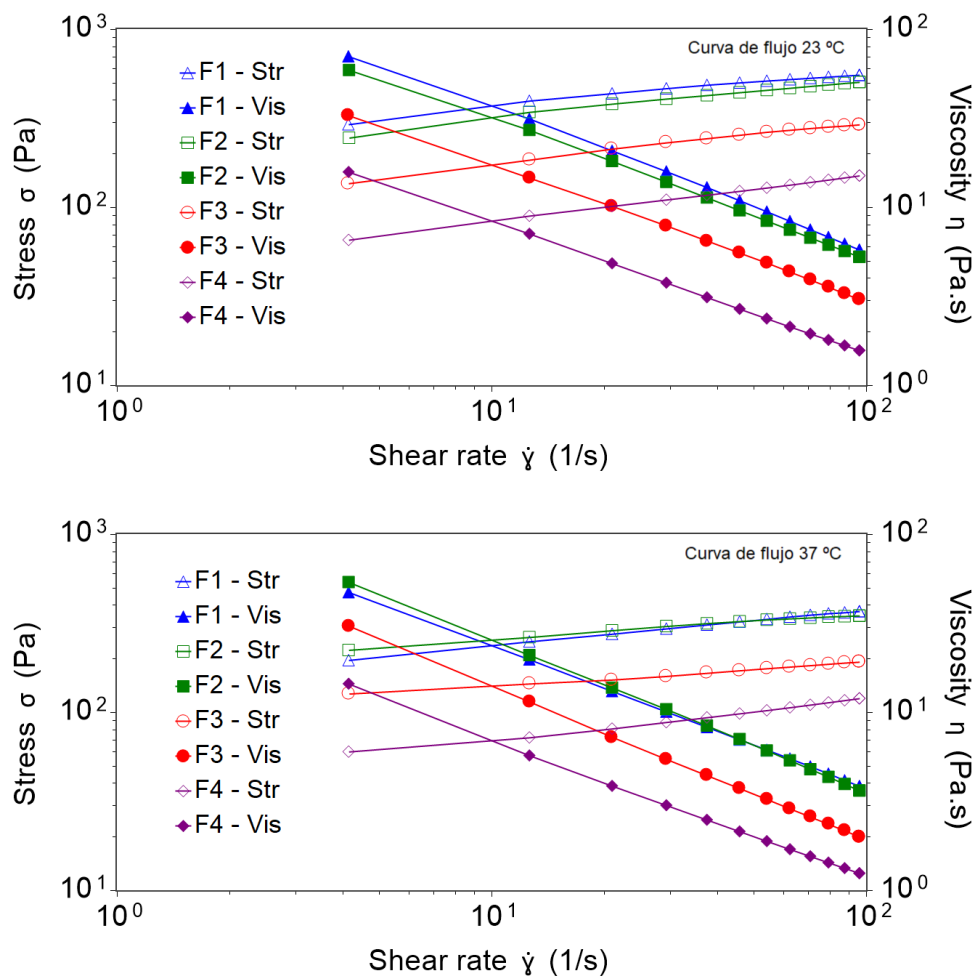


Figura 4.4-1. Reogramas de las tintas F1-F4 a 23 °C (arriba) y 37 °C (abajo).

Comparativamente (e independientemente de la temperatura de medición), el efecto de la ranitidina sobre la viscosidad de F4 resultó mayor que en el caso de F2, presentando esta última una curva de viscosidad prácticamente solapada a F1. De ese modo, la presencia de API apenas afectó al comportamiento de las tintas con almidón, pues a 37 °C las rectas

fueron prácticamente iguales y a 23 °C la diferencia fue menor. Paralelamente, todas las tintas presentaron un comportamiento pseudoplástico, pues su viscosidad aparente disminuyó a medida que aumentó la velocidad de corte.

En la Tabla 4.4-1 se muestran los valores obtenidos del ajuste de los valores experimentales a los distintos modelos matemáticos y los coeficientes de correlación correspondientes.

Tabla 4.4-1. Ajuste de los valores experimentales a los modelos matemáticos seleccionados.

Modelo	Fórmula	T (C°)	K (Pa·s ⁿ)	n	τ_0 (Pa)	μ_∞ (Pa.s)	R ²
Ley de Potencia	F1	23	265,72	0,16	-	-	0,9962
		37	150,17	0,20	-	-	0,9987
	F2	23	210,09	0,19	-	-	0,9991
		37	192,97	0,13	-	-	0,9940
	F3	23	103,92	0,23	-	-	0,9915
		37	101,94	0,14	-	-	0,9932
	F4	23	45,80	0,26	-	-	0,9995
		37	38,06	0,25	-	-	0,9992
Herschel-Bulkley	F1	23	691,91	0,08	-448,00	-	0,9977
		37	263,11	0,14	-125,00	-	0,9996
	F2	23	377,19	0,13	-183,00	-	0,9999
		37	138,59	0,03	-1210,00	-	0,9968
	F3	23	803,12	0,05	-732,00	-	0,9989
		37	27,05	0,30	85,70	-	0,9991
	F4	23	47,69	0,25	-2,35	-	0,9995
		37	26,33	0,30	15,00	-	0,9998
Sisko	F1	23	255,11	0,18	-	-0,37	0,99994
		37	144,51	0,22	-	-0,22	0,99999
	F2	23	202,35	0,21	-	-0,30	0,99999
		37	184,77	0,15	-	-0,25	0,99996
	F3	23	90,17	0,30	-	-0,72	0,99999
		37	108,45	0,11	-	0,17	0,99997
	F4	23	45,29	0,27	-	-0,03	0,99993
		37	39,66	0,23	-	0,07	0,99999

Del mismo modo que en el capítulo 2, aunque los valores de R^2 para todos los modelos fueron cercanos a uno, los valores negativos del umbral de fluencia (τ_0) y de la viscosidad a velocidad de corte infinita (μ_∞), en los modelos de Herschel-Bulkley y Sisko respectivamente, hicieron que estos modelos fueran descartados, siendo seleccionada la Ley de Potencia como el más apropiado para representar los datos.¹⁹¹ Aplicando este modelo, se obtuvo un índice de flujo (n) inferior a 1 en todos los ensayos, corroborando el comportamiento pseudoplástico de las tintas, el cual además se acentúa con el aumento de la temperatura (los valores de n disminuyen), a excepción de F1 donde se observa el efecto contrario. La temperatura tiene efecto también sobre el índice de consistencia (K), que disminuye en todas las tintas al pasar de 23 °C a 37 °C, indicando un descenso de la viscosidad aparente a medida que aumenta la temperatura. La presencia de almidón en las tintas da lugar a valores de K mayores y la presencia de API en la composición, por el contrario, hace que este índice disminuya.

4.4.2.2. Tixotropía y velocidad de recuperación.

El ensayo SFM permitió observar, sobre cada una de las tintas, el efecto de una velocidad de corte pequeña y constante aplicada durante un tiempo (Etapa 1), la destrucción de la estructura interna del gel con una velocidad de corte mayor (Etapa 2) y la regeneración de esa estructura al reducir de nuevo la cizalla aplicada (Etapa 3) (Figura 4.4-2).

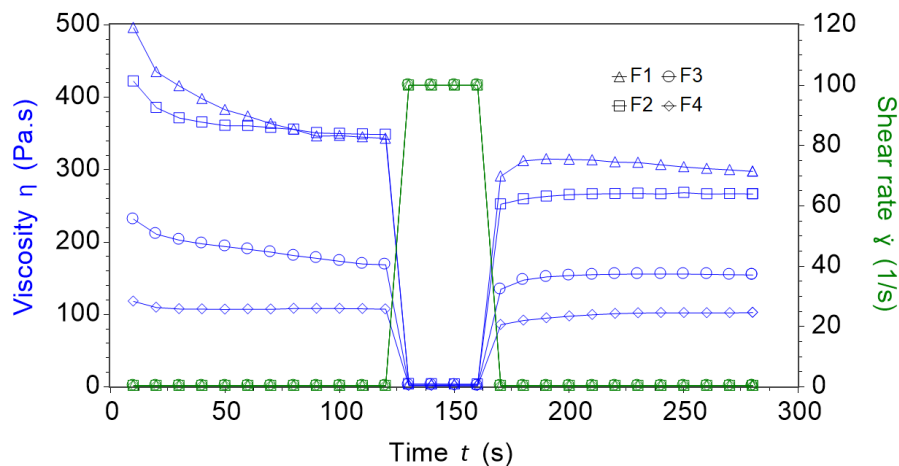


Figura 4.4-2. Ensayo de recuperación para evaluación de la tixotropía de las tintas F1-F4.

Durante la primera etapa del ensayo se produjo una disminución de la viscosidad en todas las fórmulas, reflejando su tixotropía, aunque a distintos niveles. Las tintas sin ranitidina

(F1 y F3) presentaron este fenómeno de forma más acusada. A su vez, las tintas con almidón en su composición (F1 y F2) resultaron proporcionalmente más tixotrópicas que sus análogas sin almidón (F3 y F4, respectivamente).

La composición F4 alcanzó la viscosidad de equilibrio prácticamente a los 20 s, mientras que el resto de las tintas necesitó más tiempo para equilibrarse. Resultó remarcable el hecho de que F1 y F2 llegaron a estabilizarse casi en el mismo valor de viscosidad, mientras que F3 y F4 tuvieron viscosidades muy distintas a lo largo de todo el ensayo. Por lo tanto, el efecto de la presencia de API vuelve a amortiguarse de forma notable en las tintas con almidón. En cuanto a la aplicación de una velocidad de corte mayor en la segunda etapa (120 s^{-1}), todas las tintas respondieron de forma similar disminuyendo sus viscosidades hasta niveles mínimos (su valor se redujo más de un 98,5%), demostrando de nuevo que son fluidos estructurados y pseudoplásticos, como se dedujo de las curvas de flujo anteriores. Finalmente, la etapa de recuperación mostró buenos porcentajes de reestructuración de las tintas, todos superiores al 70%, reafirmando el comportamiento tixotrópico en todos los casos (Tabla 4.4-2 y Figura 4.4-3).

Tabla 4.4-2. Disminución y recuperación de la viscosidad calculados a distintas etapas del ensayo.

	ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3	
	Disminución de μ (%)	Disminución de μ (%)	Recuperación de μ (%)	
			40s	120s
F1	30,37	98,95	89,19	88,68
F2	17,20	98,91	74,41	75,68
F3	25,58	98,80	85,32	88,54
F4	8,69	98,60	85,80	91,47

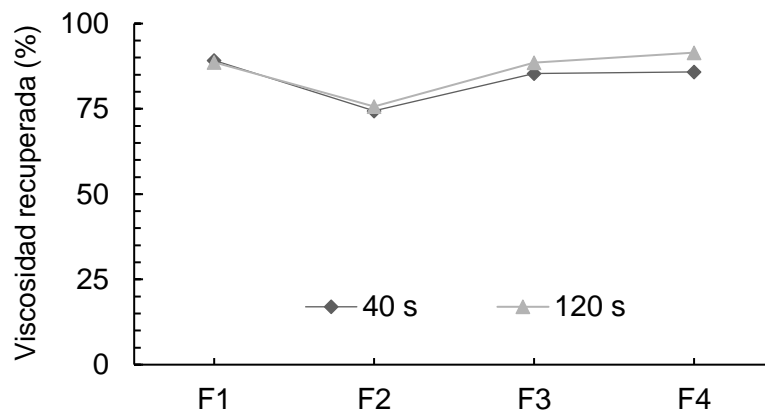


Figura 4.4-3. Representación de los porcentajes de recuperación de la viscosidad calculados transcurridos 40 s y 120 s desde la segunda etapa (100 s^{-1}).

Más en detalle, F1 recuperó su viscosidad más rápido y en mayor proporción que F2; en cambio F3 y F4 recuperaron casi por igual (F4 ligeramente más, a largo plazo). El porcentaje de recuperación resultó mayor con el incremento del tiempo, excepto en el caso de F1 que fue ligeramente inferior debido a un descenso de la viscosidad al final de la etapa, muy probablemente inducido por la pequeña velocidad de corte que se aplicó en esta etapa también. F3 y F4 recuperaron más en porcentaje, pero más lentamente.

4.4.2.3. Barridos de esfuerzo: determinación de LVR, γ_c y τ_0

Los barridos de esfuerzo de las distintas fórmulas a 23 °C y 37 °C de temperatura, para una frecuencia de 1 Hz, son recogidos en la Figura 4.4-4.

La evaluación de los valores de G' y G'' en la región LVR reflejó el carácter viscoelástico de la muestra. En el caso de estas tintas, el valor del módulo elástico (G') fue mayor que el módulo viscoso (G'') independientemente de su composición y de la temperatura de medición y, por lo tanto, todas presentaron una estructura sólida o similar a un gel típica de un material sólido viscoelástico.

Los resultados extraídos de los barridos de esfuerzo (Tabla 4.4-3) determinaron un valor de deformación crítica (γ_c) más pequeño y, por ende, una LVR más corta, a las tintas con almidón en su fórmula. F1 y F2, además, demostraron un mayor carácter termosensible pues su deformación crítica (γ_c) aumentó con el incremento de la temperatura, pasando de un 6% a un 16%, lo cual es indicativo de un carácter más líquido. Por el contrario, la extensión de la LVR de F3 y F4 se mantuvo en valores muy similares a ambas temperaturas. Es importante mencionar también que la incorporación del API no provocó ninguna alteración en los valores de deformación crítica (γ_c) pues fueron prácticamente iguales a los de sus análogas sin fármaco.

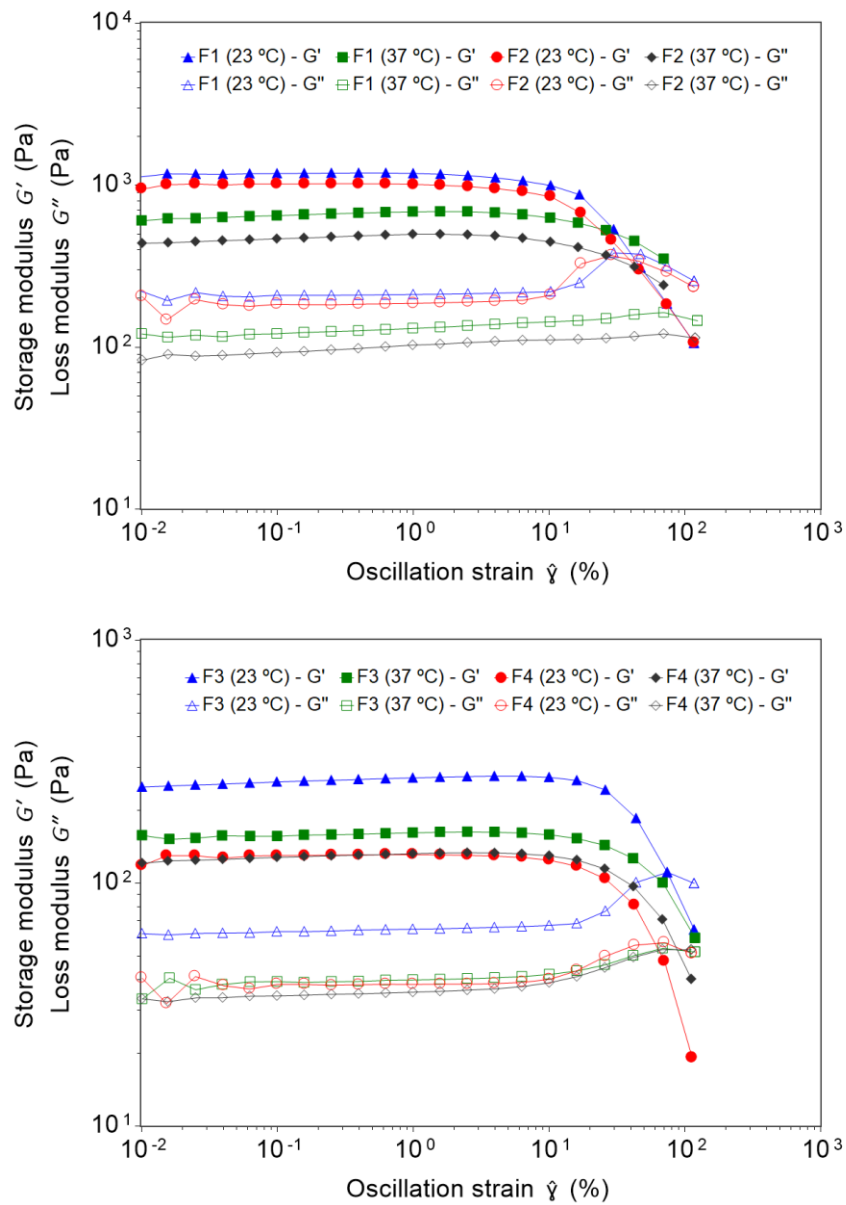


Figura 4.4-4. Barridos de esfuerzo de F1-F2 (arriba) y F3-F4 (abajo) realizados a 23 °C y 37 °C.

Tabla 4.4-3. Valores de deformación crítica (γ_c) determinados para F1 – F4.

	γ_c (%)	
	23 °C	37 °C
F1	6,45	16,40
F2	6,45	16,40
F3	26,09	25,80
F4	25,98	25,81

Por otro lado, la determinación del umbral de fluencia (τ_0) mediante las curvas de flujo o a través de la extracción de datos de un modelo matemático como Herschel-Bulkley resultaron incompatibles en estas tintas por motivos prácticos. Por su comportamiento como sólido viscoelástico (sobre todo a temperatura ambiente), con el aumento del esfuerzo de corte se produce un deslizamiento de la muestra entre los platos, y el umbral de fluencia medido es menor al real de la muestra, llegando a obtenerse valores negativos (Tabla 4.4-1), como en este caso.^{133,135} Como se ha mencionado anteriormente, de forma alternativa se pueden utilizar los barridos de esfuerzo para determinar la tensión en la cual ocurre la deformación irreversible de la muestra. Los valores determinados a partir de la gráfica esfuerzo - deformación oscilatoria se recogen en la Tabla 4.4-4.

Tabla 4.4-4. Valores de umbral de frecuencia (τ_0) estimados para F1 – F4.

	τ_0 (Pa)	
	23 °C	37 °C
F1	152,95	98,84
F2	129,02	70,30
F3	66,22	38,80
F4	30,04	31,76

Para que un fluido pseudoplástico se emplee como una tinta imprimible en 3D debe tener un umbral de fluencia que pueda ser superado fácilmente para iniciar la extrusión. De forma esperada por su carácter termorreversible, los valores de τ_0 disminuyeron al aumentar la temperatura, requiriendo una menor fuerza de extrusión para iniciar el flujo de tinta si se configura una temperatura en el cabezal superior a la temperatura ambiente. Del mismo modo, las tintas con almidón presentaron τ_0 mayores, lo que les aporta también una mayor resistencia mecánica.⁷⁹ De nuevo, la presencia de ranitidina tuvo un efecto notablemente mayor en las propiedades reológicas de la tinta sin almidón (F4), llegando a reducir el valor de τ_0 a 23 °C a prácticamente la mitad de la de su análoga sin API (F3).

4.4.2.4. Barridos de frecuencia: evaluación de $\tan(\delta)$.

Al igual que los barridos de esfuerzo, los barridos de frecuencia confirmaron el comportamiento típico de gel débil para las cuatro fórmulas, pues los valores G' resultaron superiores a los de G'' y paralelos entre sí.^{88,295} A su vez, F3 y F4 mostraron un módulo

elástico (G') con mayor dependencia de la frecuencia, lo cual denota una mayor fluidez del material (Figura 4.4-5).¹¹⁶

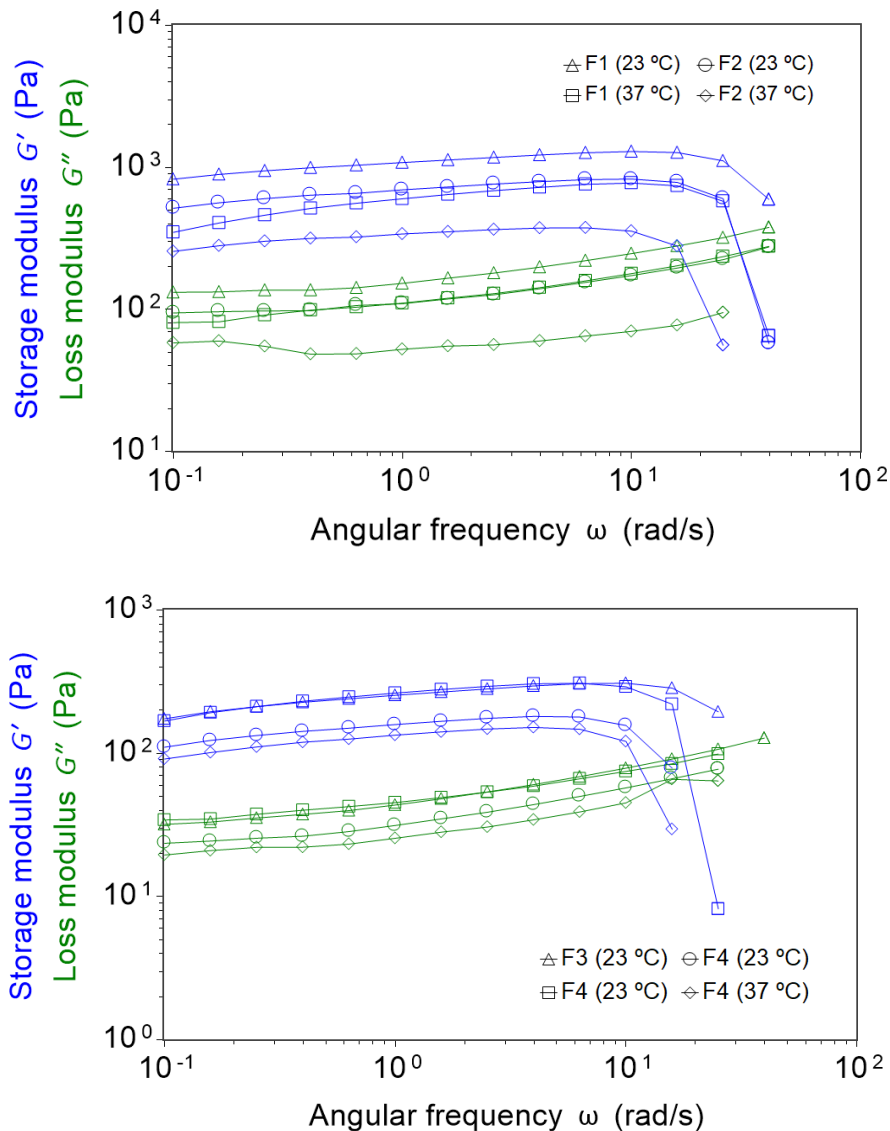


Figura 4.4-5. Barridos de frecuencia de F1-F2 (arriba) y F3-F4 (abajo) realizados a 23 °C y 37 °C.

Paralelamente, las diferentes fórmulas presentaron valores de $\tan(\delta)$, indicador de la fortaleza de la red tridimensional del gel, prácticamente independientes de la temperatura y de la frecuencia. De manera previsible, la adición de almidón a la fórmula supuso una disminución de los valores de $\tan(\delta)$ indistintamente de la presencia de ranitidina (Figura 4.4-6), hecho que se corresponde con una estructura interna más fuerte y va en consonancia con una mayor capacidad autoportante.^{296,297}

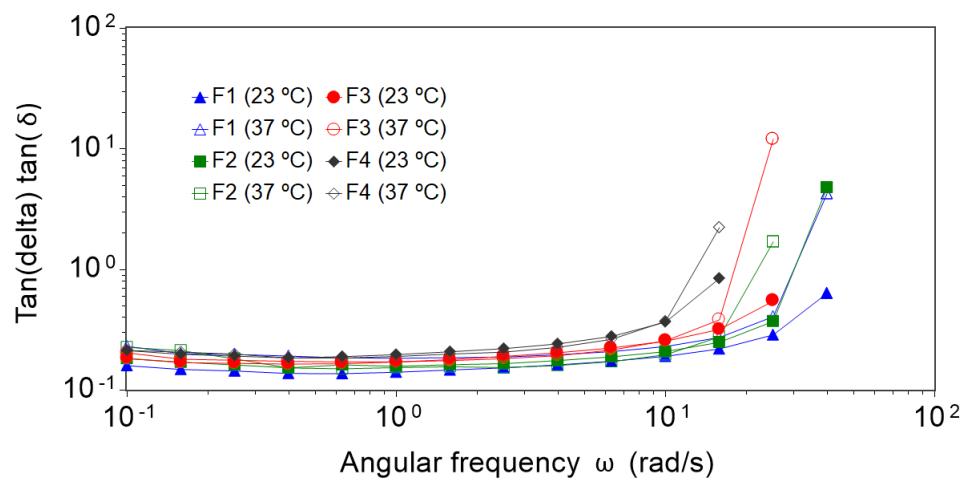


Figura 4.4-6. Comparativa de la variación de la tangente de pérdidas con respecto a la frecuencia a 23 °C y 37 °C.

4.5. Caracterización del principio activo en la fórmula

Los sólidos farmacéuticos pueden clasificarse como sólidos cristalinos, con patrones moleculares regulares que se repiten en tres dimensiones, o sólidos amorfos, que carecen del orden de largo alcance presente en los cristales. Estas diferencias dan como resultado propiedades físicas y químicas sustancialmente distintas entre ellos. Aunque los sólidos amorfos a menudo tienen propiedades farmacéuticas deseables, como velocidades de disolución más rápidas que sus homólogos cristalinos, no son comercializados tan ampliamente como las formas cristalinas debido a su menor estabilidad química y a su tendencia innata a cristalizar.²⁹⁸

A su vez, los sólidos farmacéuticos también pueden mostrar polimorfismo, es decir, existir como dos o más fases cristalinas que tienen diferentes disposiciones y/o conformaciones de las moléculas en la red cristalina. Del mismo modo, los distintos polimorfos pueden tener diferentes propiedades fisicoquímicas (punto de fusión, solubilidad, velocidad de disolución, estabilidad...), mecánicas (dureza, fluidez, resistencia...) o espectroscópicas. Como resultado, tanto la biodisponibilidad como la dosis eficaz administrada a los pacientes pueden variar considerablemente.^{288,298} De esta manera, la comprensión, manipulación y control de formas polimórficas son aspectos esenciales para el desarrollo de productos en la industria farmacéutica, y por ello, de necesaria comprobación en la preparación de las *drugmies*.

En el caso del clorhidrato de ranitidina, se ha documentado que exhibe polimorfismo y que puede existir en dos estados cristalinos, denominados *Forma 1* y *Forma 2*. Sin embargo, se conoce que la biodisponibilidad y la eficacia terapéutica de ambas formas son equivalentes, por lo que el principio activo puro para formulación suele comercializarse como *Forma 2*, por su mayor estabilidad.^{288,289,299}

Hasta la fecha, se han utilizado muchas técnicas físicas diferentes para la caracterización de la forma sólida de los productos farmacéuticos, incluida la difracción de rayos X, la espectroscopía óptica, el análisis térmico y la microscopía. En el presente trabajo se emplearon la Difracción de Rayos X de Polvo (en inglés, *X-Ray Powder Diffraction* o XRPD) y la Calorimetría de Barrido Diferencial (en inglés, *Differential Scanning Calorimetry* o

DSC), método básico y de referencia para caracterización física del API, tanto en la forma comercial pura como una vez incorporado a ambas formulaciones.

4.5.1. Difracción de Rayos X de Polvo (XRPD)

La Difracción de Rayos X de muestras en polvo es una técnica de caracterización no destructiva para todo tipo de material con estructura cristalina. Cuando un compuesto cristalino es alcanzado por un haz de radiación cuya longitud de onda es de similar magnitud a la distancia interatómica, éste se difunde dando lugar a diferentes tipos de interferencias que son constructivas en unas direcciones privilegiadas. De ese modo, el haz de luz que difracta depende de la disposición geométrica y del tipo de átomos presentes, dando lugar a un espectro de difracción único que permite la identificación del sólido.^{300,301}

Materiales y métodos

El ensayo XRPD se llevó a cabo utilizando un difractómetro de rayos X X'Pert Pro MPD (PANalytical, UK), con un rango angular 2Theta de adquisición de 5 a 50° y un registro en modo continuo con una velocidad constante de 0,02°/s. El difractómetro está equipado con un tubo de Cu LFF, juego de rendijas fijas de ¼ (divergencia), ½ (antidispersora primaria) y 7.5 mm (antidispersora secundaria), rendijas Soller de 0,04 rad (primaria y secundaria) y filtro de Ni para monocromatizar al doblete k-Alpha (1.540598-1.544426 Angst.).

Las muestras de ranitidina pura y de las tintas con API (F2 y F4) se enrasaron y compactaron sobre un portamuestras de fondo cero (ZBH). En el caso de la ranitidina, como el polvo tenía una granulometría muy superior a la adecuada para el ensayo (entre 1 y 100 micras), se redujo previamente utilizando un mortero de ágata (Figura 4.5-1). Por otro lado, las muestras de tinta se dejaron entre 5 y 10 min en una mufla a 60 °C para disminuir su viscosidad y facilitar su colocación en el portamuestras.

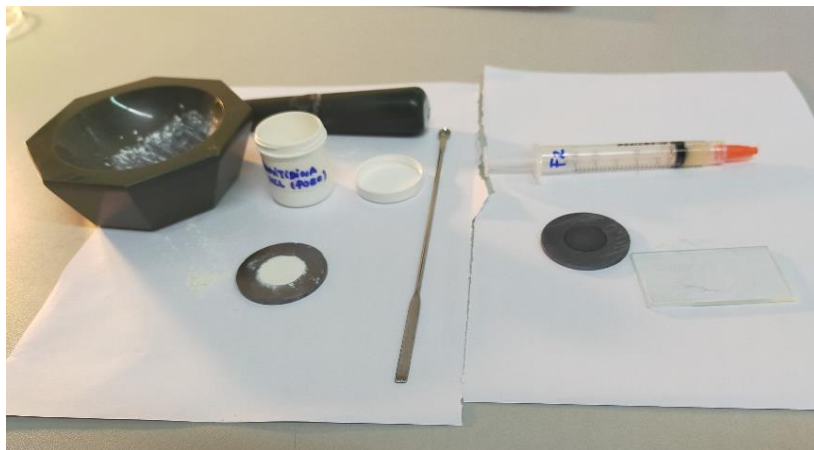


Figura 4.5-1. Preparación de las muestras para el análisis XRPD. Imagen cedida por Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Oviedo.

Resultados

Tal y como se puede observar en los difractogramas, los geles resultaron muy diferentes al principio activo puro desde el punto de vista cristalino. Así, el difractograma de la ranitidina presentó distintos máximos en la intensidad a determinados ángulos 2θ conocidos como picos de Bragg, que no se observaron en el de F2 ni en el de F4 (Figura 4.5-2).

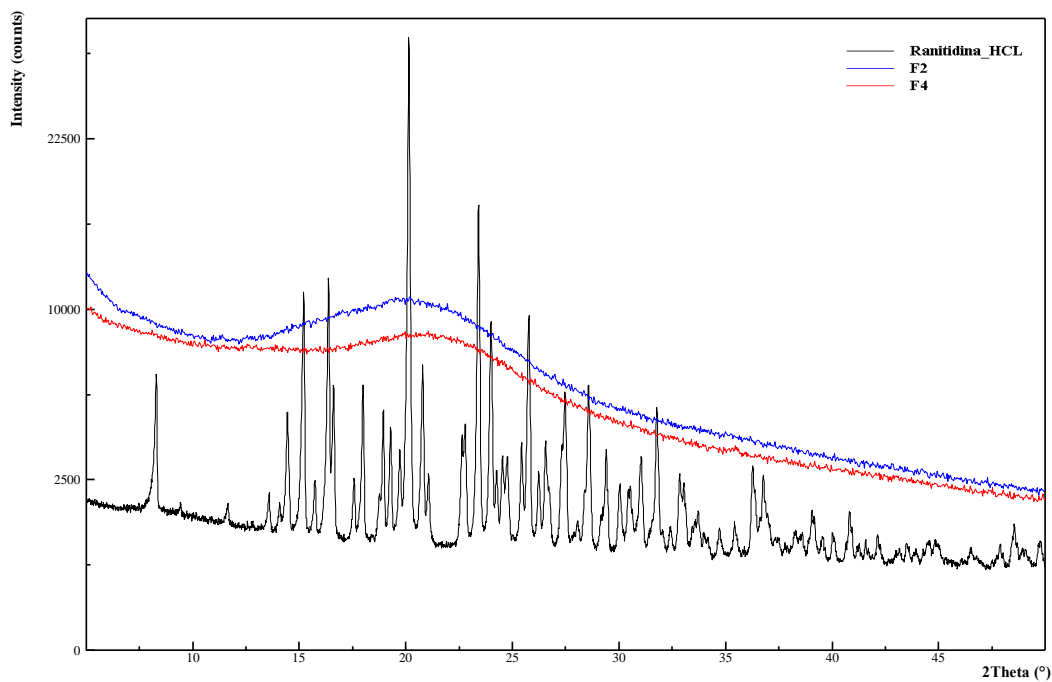


Figura 4.5-2. Difractogramas correspondientes al clorhidrato de ranitidina y a las tintas F2 y F4.

Estos últimos mostraron una protuberancia o joroba ancha sobre 20° en 2θ , que se extendía un buen rango angular, y que es característica del material amorfo. Dado que sobre dicha señal no se observó ninguno de los picos de Bragg, se pudo concluir que la ranitidina se encontraba en estado amorfo dentro de ambas fórmulas. Por otro lado, los picos de alta intensidad que se visualizaron a $20,2$ y $23,5^\circ 2\theta$ en el principio activo comercial puro son específicos para la *Forma 2*, la forma más estable.^{288,302,303}

4.5.2. Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)

La calorimetría de barrido diferencial (del inglés: *Differential Scanning Calorimetry* o DSC) es una técnica termoanalítica que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas.³⁰⁴ De ese modo, se monitorizan los cambios de entalpía causados por modificaciones en las propiedades químicas y físicas del material, permitiendo así su identificación y caracterización.

Una de las evaluaciones más frecuentes realizadas en DSC es la determinación de los valores de los picos que aparecen en los termogramas siendo los principales la temperatura *onset* o de inicio (T_{on}) y la temperatura del pico máximo (T_m). En sustancias puras, la T_{on} es la temperatura de fusión. Sin embargo, si los picos son amplios, la temperatura de inicio no se puede determinar con precisión y pierde su significado físico, siendo entonces T_m la que define la temperatura de fusión.³⁰⁵ La calorimetría diferencial de barrido es una técnica muy empleada para identificar sólidos farmacéuticos por ser rápida, muy sensible y fácil de usar.

Materiales y métodos

Se analizaron térmicamente muestras de clorhidrato de ranitidina pura y de las tintas que contenían fármaco (F2 y F4) usando un calorímetro de barrido diferencial DSC822e (Mettler-Toledo, EE.UU.), bajo un flujo de gas nitrógeno de 50 ml/min. Las muestras se introdujeron en un portamuestras de aluminio y se calentaron a una velocidad de $2^\circ\text{C}/\text{min}$ y $10^\circ\text{C}/\text{min}$ de 0 a 160°C .

Resultados

El análisis térmico (DSC) del clorhidrato de ranitidina mostró un pico máximo (T_m) a 143-145 °C, correspondiente al punto de fusión y confirmando el estado cristalino del fármaco (Anexo III, Figura AIII.1).^{288,303,306} Sin embargo, en el caso de las tintas cargadas con fármaco, los termogramas con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min mostraron picos superpuestos (Anexo III, Figura AIII.2 y Figura AIII.3), que desaparecieron al reducir la velocidad de calentamiento. En los termogramas realizados a 2 °C/min se observó únicamente una amplia transición endotérmica alrededor de 90 °C (Anexo III, Figura AIII.4 y Figura AIII.5), probablemente debida a la pérdida de humedad de la composición, hecho que sugiere que la ranitidina estaba presente en estado amorfo dentro de la matriz de tinta.^{307,308}

En esta línea, al recopilar los valores de T_{on} y T_m de los termogramas, se observó que las temperaturas variaron según la velocidad de calentamiento, disminuyendo cuando es más lenta (Tabla 4.5-1). El hecho de que las temperaturas de F2 y F4 no sean iguales o muy parecidas a ambas velocidades ratifica que el proceso que tiene lugar en el calentamiento es un proceso cinético que depende de la velocidad (por ejemplo, una descomposición) y no un proceso termodinámico (fusión), en el cual la temperatura sería siempre igual o muy similar, como sucede en el API puro.

Tabla 4.5-1. Temperatura onset (T_{on}) y temperatura del pico máximo (T_m) del clorhidrato de ranitidina, F2 y F4 a distintas velocidades de calentamiento.

	T_{on}	T_{on}	T_m	T_m
	10 °C/min	2 °C/min	10 °C/min	2 °C/min
Ranitidina	135,2	133,1	143,6	136,5
F2	79,9	40,1	103	85
F4	61,9	54,8	102,3	92,4

Así pues, tanto el análisis por XPRD como por DSC sugieren que el API se encuentra en estado amorfo en las tintas mientras que la forma comercial pura es cristalina.

4.6. Proceso de impresión y validación de la tecnología para la fabricación de unidades posológicas

Como nueva tecnología de fabricación, la impresión 3D se enfrenta a varios desafíos legislativos previos a su adopción generalizada en el sector de la salud, especialmente en mercados altamente regulados como la industria farmacéutica.

La falta de un marco para la aprobación de productos farmacéuticos impresos, así como la ausencia de estandarización de las impresoras 3D para cumplir con requisitos regulatorios y de calidad, resultan un inconveniente importante para que la fabricación de medicamentos personalizados sea una realidad. En esta línea, la investigación de las especificaciones y requerimientos a cumplir por los materiales de partida (tintas) y el proceso de producción (software implicado, impresora 3D...) pueden permitir una evaluación de su idoneidad para la obtención de estos productos farmacéuticos. A su vez, la calificación de las impresoras 3D como parte de un proceso con garantía de calidad posiblemente podría conducir a una aceleración del procedimiento de aprobación de esta tecnología, al confirmar la capacidad de la impresora para cumplir con las especificaciones de fabricación de manera reproducible.

A pesar de que en la industria farmacéutica tradicional se aplica de forma estricta un sistema adecuado de garantía de calidad, éste no exime del control al producto terminado. Aún con todas las precauciones que se puedan tomar a nivel de la fabricación o la preparación de los productos, los pacientes y los profesionales de la salud no están a salvo de los incidentes que se puedan presentar en las distintas etapas del proceso de fabricación, y es por ello necesaria una evaluación de la producción. En la fabricación de formas farmacéuticas orales sólidas, el esquema básico de un protocolo de control de calidad para un producto terminado de una formulación incluye, como ensayos fisicoquímicos fundamentales, los ensayos de Identificación, Valoración, Uniformidad de Unidades de Dosificación (UUD) y el Test de Disolución.³⁰⁹

El ensayo de Identificación tiene por objeto confirmar que dicho producto se ajusta a la descripción dada en el rótulo del envase. Por otro lado, la Valoración del medicamento determina la cantidad media del principio activo presente en el lote analizado. Para ello, se

emplean distintas técnicas analíticas, siendo la cromatografía, la espectrofotometría y la volumetría las más comúnmente utilizadas. La Valoración del medicamento representa el contenido promedio en el lote y permite realizar la evaluación de la UUD para analizar la cantidad incluida en cada una de las unidades que verdaderamente se administran al paciente. La Uniformidad de Unidades de Dosificación se define como el grado de homogeneidad en la cantidad de principio activo de las unidades de dosificación y comprende dos ensayos principales: Uniformidad de Masa y Uniformidad de Contenido. Finalmente, se realiza el Test de Disolución para simular el comportamiento *in vitro* de las dosis farmacéuticas y predecir su biodisponibilidad y eficacia.

Partiendo de esta premisa, para justificar la aceptabilidad del proceso de impresión 3D como metodología para la fabricación de dosis unitarias personalizadas, en esta Tesis se ha decidido adoptar este protocolo y se ha realizado una aproximación a distintos capítulos de la Farmacopea Europea (Ph. Eur., en inglés *European Pharmacopoeia*) y de la Farmacopea de Estados Unidos (USP, del inglés *United States Pharmacopoeia*) para la ejecución de algunos de los ensayos necesarios. Las farmacopeas reúnen monografías que describen normas de calidad para todos los principales medicamentos y que son de obligado cumplimiento para todos los fármacos que se venden en los respectivos territorios, de modo que los consumidores tengan garantía de los productos obtenidos de las farmacias y otros proveedores legales.

En esta sección del capítulo se abordan las etapas de impresión de las formas farmacéuticas y de evaluación del producto obtenido mediante esta tecnología de fabricación. En el caso de las *drugmies*, al carecer todavía de envasado final, se ha realizado un análisis visual y de ejecución de forma para cumplir de forma análoga con el ensayo de identificación. En cuanto a la valoración, debido a que la estructura química del principio activo lo permite, se ha empleado espectrofotometría UV-Vis para la cuantificación de ranitidina clorhidrato en las tintas formuladas. La UUD se ha determinado siguiendo las monografías 2.9.5 *Uniformity of Mass of Single-Dose Preparations* y 2.9.6 *Uniformity of Content of Single-Dose Preparations* de la Farmacopea Europea.^{310,311} En último lugar, se ha empleado el método de disolución de la monografía de la USP para comprimidos de ranitidina (USP 43-NF 38) para la realización del Test de Disolución, ya que no se ha establecido un ensayo específico para las dosis masticables como las *drugmies*.

4.6.1. Selección y configuración de los modelos 3D para la fabricación de las *drugmies*


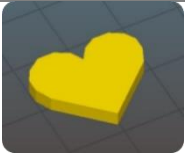


Para cumplir con el objetivo de fabricar formas farmacéuticas que fueran atractivas y divertidas para una mayor aceptación de la población pediátrica, se emplearon modelos 3D con forma de corazón y osito de goma. Estos modelos en formato STL se descargaron de la plataforma abierta MakerBot Thingiverse. Paralelamente también se incluyó un modelo sencillo, diseñado por IDONIAL, en forma de disco o pastilla clásica.

Se empleó el software de corte de código abierto Slic3r para convertir archivos de formato STL a archivos de extensión .gcode, el formato legible por impresora. Mediante Slic3r se ajustaron los distintos parámetros de impresión, que dieron lugar a una configuración y ejecución concreta de la pieza, afectando directamente a las propiedades físicas de la *drugmie* resultante (masa, resistencia mecánica, aspecto...).

Todos los parámetros de impresión se mantuvieron iguales para la ejecución de los distintos modelos, excepto la altura de la capa, la densidad del relleno, el número de perímetros y las capas sólidas superiores (Tabla 4.6-1). La altura de la capa se redujo de 0,50 mm a 0,45 mm para adquirir una mayor definición en figuras más complejas, en este caso, los ositos. A su vez, en estas figuras se aumentó el número de perímetros a 2 para aportar mayor resistencia mecánica a estas piezas de mayor complejidad. Además, con la intención de crear dos *drugmies* con una misma apariencia, pero con diferente masa, la densidad de relleno de este modelo 3D se redujo del 80% al 65% para imprimir algunos lotes de *drugmies*. Las figuras en forma de disco y corazón se imprimieron con una densidad de relleno fija del 80%, pero con distinta configuración de la capa superior (sólida en el disco y al 80% de relleno en el corazón), para poder apreciar la influencia de este parámetro en el acabado final de las piezas con superficie plana.

Se utilizaron como boquillas de impresión puntas dispensadoras de extremo romo de acero inoxidable con 0,51 mm de diámetro interior (21G). Antes del proceso de impresión, las jeringas se templaron introduciéndolas en un baño a 37 °C durante 30 min. La temperatura del cabezal de impresión se fijó en 37 °C para mantener la tinta lo suficientemente fluida como para ser extruida a través de la boquilla y dibujar correctamente las trayectorias realizadas por la impresora. La temperatura del lecho de impresión se ajustó a 15 °C para asegurar la gelificación in situ inducida por la temperatura de la tinta.

Tabla 4.6-1. Parámetros de impresión empleados en los distintos modelos de drugmies

				
Modelo 3D	<i>Disco</i>	<i>Corazón</i>	<i>Osito 80%</i>	<i>Osito 65%</i>
Velocidad primera capa	95%	95%	95%	95%
Diámetro de boquilla	0,51 mm	0,51 mm	0,51 mm	0,51 mm
Ángulo de relleno	45°	45°	45°	45°
Densidad de relleno	80%	80%	80%	65%
Patrón de relleno	Rectilíneo	Rectilíneo	Rectilíneo	Rectilíneo
Perímetros	1	1	2	2
Capas sólidas superiores	1	0	0	0
Capas sólidas inferiores	1	1	1	1
Altura primera capa	0,5 mm	0,5 mm	0,45 mm	0,45 mm
Altura de capa	0,5 mm	0,5 mm	0,45 mm	0,45 mm
Tiempo de impresión aproximado	6 min	5 min 30 s	12 min	12 min

Determinación de la velocidad de impresión y del número de faldas

Para establecer una velocidad adecuada de impresión y valorar la fidelidad en la reproducción del modelo, se realizaron unas pruebas rápidas de velocidad baja (8 mm/s), media (15 mm/s) y alta (24 mm/s). Basadas en la ejecución de un cuadrado de 20 x 20 x 0,5 mm con un relleno del 0%, se imprimen únicamente los trazos correspondientes al perímetro (Figura 4.6-1). De esta manera, se puede medir el grosor y la regularidad del trazo en función de la velocidad de movimiento del cabezal y el número de faldas seleccionado.

La velocidad determinará en gran medida el tiempo de ejecución, pero en la mayoría de los casos es preferible un mayor tiempo, pero una mejor resolución y una deposición más

controlada del material. Por otro lado, las faldas son altamente convenientes para asegurar un flujo continuo antes de empezar a imprimir la pieza, pero cuanto mayor sea el número que ejecutar, mayor cantidad de material se desaprovecha. La Tabla 4.6-2 recopila los valores de grosor de los trazos medidos.

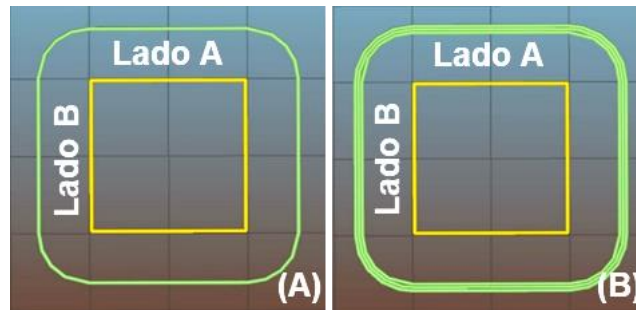


Figura 4.6-1. Previsualización del modelo a ejecutar con 1 falda (A) y 3 faldas (B) e identificación de los lados a medir.

Tabla 4.6-2. Grosor del trazo (mm) en función de la velocidad de impresión y del número de faldas.

1 Falda - 8mm/s	Lado A	Lado B	Grosor del trazo
Test 1	20,0	20,1	0,621
Test 2	20,0	20,0	0,620
Test 3	20,0	20,1	0,620
Promedio	20,000	20,067	0,620
SD	0,000	0,058	0,001
1 Falda - 15mm/s	Lado A	Lado B	Grosor del trazo
Test 1	19,9	20,1	0,620
Test 2	19,9	20,0	0,620
Test 3	20,0	20,1	0,616
Promedio	19,933	20,067	0,619
SD	0,058	0,058	0,002
1 Falda - 24mm/s	Lado A	Lado B	Grosor del trazo
Test 1	-	-	-
Test 2	-	-	-
Test 3	-	-	-
Promedio	-	-	-
SD	-	-	-

3 Faldas - 8mm/s	Lado A	Lado B	Grosor del trazo
Test 1	20,00	20,00	0,635
Test 2	20,00	20,00	0,635
Test 3	20,00	20,00	0,635
Promedio	20,000	20,000	0,635
SD	0,000	0,000	0,000
15mm/s 3 faldas	Lado A	Lado B	Grosor del trazo
Test 1	20,00	20,10	0,678
Test 2	19,90	19,90	0,674
Test 3	20,00	20,00	0,673
Promedio	19,967	20,000	0,675
SD	0,058	0,100	0,003
24mm/s – 3 faldas	Lado A	Lado B	Grosor del trazo
Test 1	19,9	20,0	0,696
Test 2	20,0	19,9	0,673
Test 3	20,0	20,1	0,673
Promedio	19,967	20,000	0,681
SD	0,058	0,100	0,013

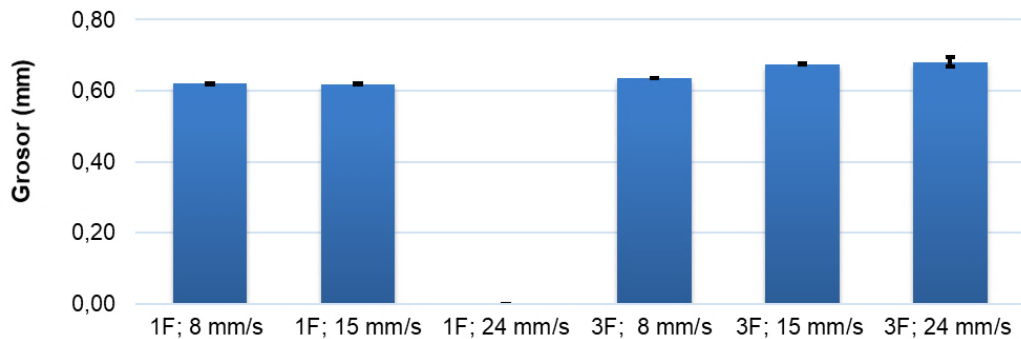


Figura 4.6-2. Representación del grosor del trazo y su desviación estándar a distintas velocidades.

A medida que se aumentó la velocidad, mayor fue la irregularidad en el grosor de los trazos. En los ensayos realizados con 1 falda a 24 mm/s no llegó a producirse deposición de tinta, por lo no se pudieron evaluar las medidas. Por otro lado, el incremento del número de faldas produjo en un aumento del grosor de la línea en todas las velocidades. Sin embargo, a velocidades media (15 mm/s) y alta (24 mm/s) este incremento fue mayor que a velocidad lenta (8 mm/s). Este efecto puede deberse a que, cuando la tinta se deposita a menor

velocidad, consecuentemente también se extruye más despacio y pasa más tiempo retenida en la punta de la boquilla, la cual se encuentra a temperatura ambiente. De ese modo, el fluido tiene un ligero tiempo de enfriamiento que le permite recuperar parte de su estructura interna y sufre menos colapso al depositarse en la base de impresión. En la misma línea, cuando se trabaja con tres faldas, se purga todo el contenido de tinta residual de la boquilla y la figura empieza a imprimirse con tinta que procede directamente del cartucho y que está atemperado a 37 °C. Así, la tinta extruida sale a mayor temperatura y, como consecuencia, se expande más al depositarse en la plataforma al no disponer de un tiempo de retención suficiente en la boquilla como para recuperar la viscosidad o la estructura interna. Cuando se trabaja con una sola falda, se extruye material suficiente como para que el fluido empiece a depositarse, pero no tanta cantidad como para que salga de la parte más caliente de la jeringa. Por ese motivo hay diferencia en el grosor entre los trazos depositados a 8 mm/s y 15 mm/s cuando se trabaja con tres faldas pero, en cambio, apenas existe en el caso de configurar una falda única (Figura 4.6-2).

Evaluación de la gelificación in situ en el proceso de impresión

Para corroborar el proceso de gelificación y la adecuación de la velocidad de impresión, se empleó una cámara termográfica (Optris® PI 230; Optris GmbH, Alemania) y se grabó la ejecución íntegra de un modelo 3D, concretamente, el osito con 80% de relleno.

Gracias a la visualización de las imágenes se pudo comprobar, por un lado, que la temperatura real del extrusor correspondía adecuadamente a la indicada mediante el software de configuración de la impresora (37 °C). Por otro lado, se pudo observar la adecuación de la velocidad para la correcta transición sol-gel de la tinta: la gelificación es lo suficientemente rápida como para que la capa anterior ya esté fría cuando la capa nueva se deposita y, por lo tanto, tenga suficiente resistencia mecánica para soportar el peso sin deformarse. Paralelamente, la gelificación es lo suficientemente lenta como para que no se produzca solidificación en la boquilla, y con ello, la consecuente obturación de esta (Figura 4.6-3).

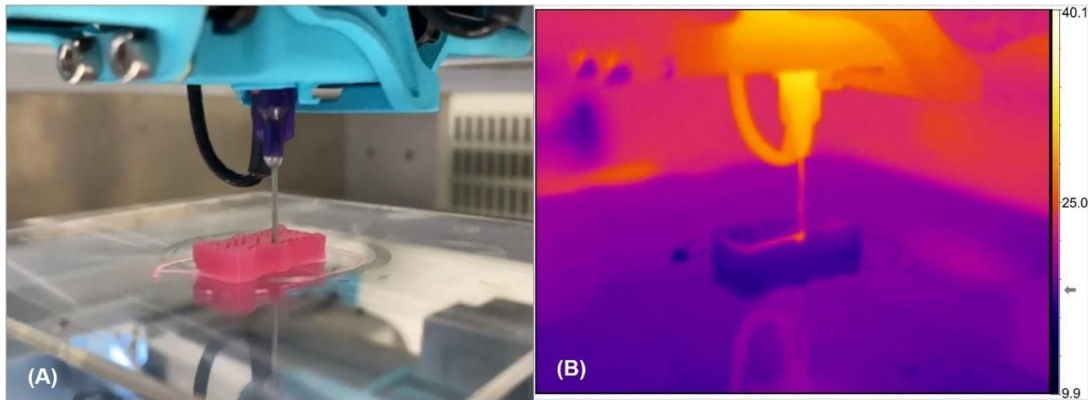


Figura 4.6-3. (A) Proceso de impresión de una *drugmie*. (B) Imagen termográfica de la gelificación *in situ* de la tinta inducida por la temperatura.

Las cuatro tintas pudieron ser empleadas sin problema para producir diferentes modelos de dosis de medicamentos impresas en 3D. El sistema de regulación de temperatura del extrusor y de la base de impresión permitió la gestión correcta del comportamiento termosensible de las tintas, reduciendo la viscosidad mediante una mayor temperatura en la jeringa para su fácil extrusión, y una rápida gelificación inducida en una plataforma de impresión fría para una recuperación en estado sólido de la tinta.

4.6.2. Ensayo de Identificación

Debido a que las *drugmies* no son un producto comercial terminado y, lógicamente, carecen de embalaje, envasado y prospecto, se realizó un ensayo de Identificación basado en un análisis visual y de manipulabilidad completo de las mismas. De ese modo, se planteó una metodología de validación análoga, que sirviera para evaluar la aptitud de los productos obtenidos a través de la cumplimentación de un formulario de resultados posterior a la observación y manipulación de las piezas impresas (Tabla 4.6-3). En este formulario, se evaluaron los puntos siguientes:

- La apariencia y características organolépticas de las figuras impresas.
- La precisión en la ejecución del modelo 3D y la reproducibilidad del diseño.
- La aptitud de las distintas *drugmies* para ser retiradas del soporte de impresión sin afectar a su integridad.

- La manipulabilidad a dos niveles: momentánea (simulando el gesto de la toma del medicamento) y prolongada (manipulando la figura durante un periodo largo de tiempo).

Tabla 4.6-3. Formulario para cumplimentar en el ensayo de identificación de las drugmies

Fórmula XX		
MODELO 3D		
Apariencia	Presencia de manchas u otras imperfecciones	Sí/No
	Uniformidad de color	Sí/No
	Deformación de la figura	Sí/No
	Superficie homogénea	Sí/No
	Fidelidad de tamaño y forma	Sí/No
Olor	Aroma agradable y adecuado	Sí/No
Manipulabilidad	Facilidad de retirada del soporte	Sí/No
	Delaminación instantánea al manipularlo	Sí/No
	Delaminación tras manipulación prolongada	Sí/No

Con la intención de explorar distintas variables en el análisis visual, se probaron los cuatro modelos 3D (disco, corazón, osito 65% y osito 80%) con un mismo lote de tinta F1. De ese modo, se pudo detectar el efecto del diseño y de los parámetros de impresión establecidos en las características del final producto impreso. Paralelamente, para evaluar la aptitud de las diferentes tintas en la ejecución de cualquier modelo, se imprimieron las combinaciones fórmula–modelo siguientes: F1 – disco, F2 - corazón. F3 - osito 80% y F4 - osito 65%. Con la intención de lograr una mejor identificación de los distintos lotes de tinta, se emplearon diferentes combinaciones de colorante.

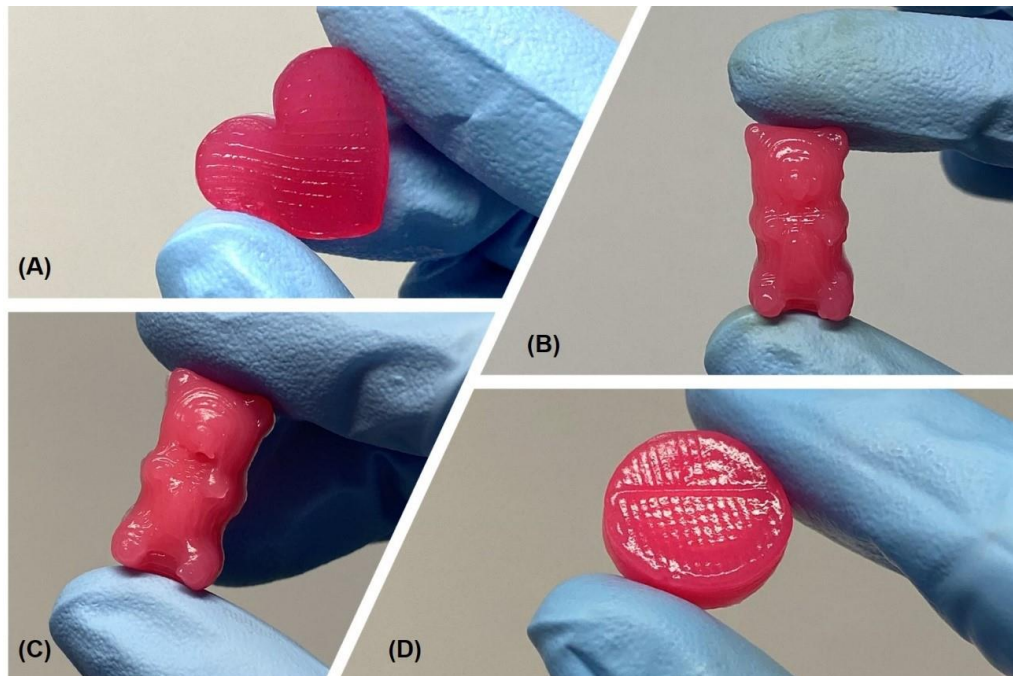


Figura 4.6-4. Apariencia de los distintos modelos de drugmies impresas con F1: corazón (A), osito 80% (B), osito 65% (C) y disco (D).

Tabla 4.6-4. Reporte de las características físicas y organolépticas de las drugmies de la tinta F1.

		F1 [R(-)CS(+)]			
		Disco	Corazón	Osito 80%	Osito 65%
Apariencia	Presencia de manchas u otras imperfecciones	No	No	No	No
	Uniformidad de color	Sí	Sí	Sí	Sí
	Deformación de la figura	No	No	No	No
	Superficie homogénea	Sí	No	Sí	Sí
	Fidelidad de tamaño y forma	Sí	Sí	Sí	Sí
Olor	Aroma agradable y adecuado	Sí	Sí	Sí	Sí
Manipulabilidad	Facilidad de retirada del soporte	Sí	Sí	Sí	Sí
	Delaminación instantánea al manipularlo	No	No	No	No
	Delaminación tras manipulación prolongada	No	No	No	Sí

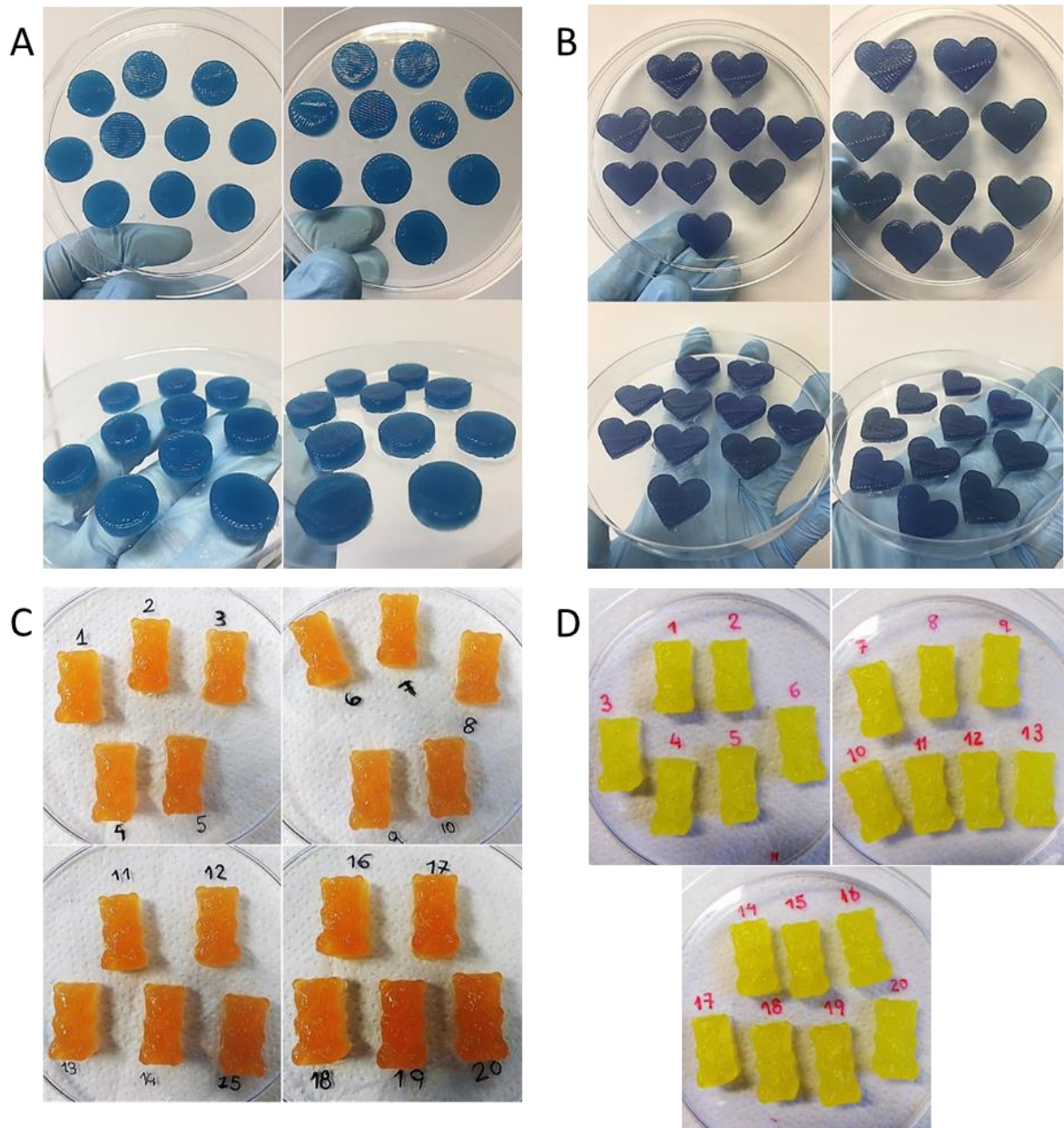


Figura 4.6-5. Apariencia de las drugmies impresas combinando fórmula-modelo: (A) F1 – disco; (B) F2 – corazón; (C) F3 – osito 80% y (D) F4 – osito 65%.

Tabla 4.6-5. Reporte de las características físicas y organolépticas de las *drugmies* de F1 - F4.

		F1	F2	F3	F4
		<i>Disco</i>	<i>Corazón</i>	<i>Osito 80%</i>	<i>Osito 65%</i>
Apariencia	Presencia de manchas u otras imperfecciones	No	No	No	No
	Uniformidad de color	Sí	Sí	Sí	Sí
	Deformación de la figura	No	No	No	No
	Superficie homogénea	Sí	Sí	Sí	Sí
	Fidelidad de tamaño y forma	Sí	Sí	Sí	Sí
Olor	Aroma agradable y adecuado	Sí	Sí	Sí	Sí
Manipulabilidad	Facilidad de retirada del soporte	Sí	Sí	Sí	Sí
	Delaminación instantánea al manipularlo	No	No	No	No
	Delaminación tras manipulación prolongada	No	No	No	Sí

Tal y como se esperaba, el aspecto de las *drugmies* resultó ligeramente distinto a consecuencia de la presencia de almidón de maíz en la tinta, obteniendo figuras de tonos pastel más blanquecinos y menor transparencia que en las fórmulas libres de almidón. Por el contrario, la presencia del clorhidrato de ranitidina no varió el color de las tintas ni el aspecto de las *drugmies*. En ningún caso se observaron partículas, manchas o partes de colores heterogéneos, confirmando así tanto la aptitud de la fórmula, como de su proceso de elaboración (Figura 4.6-4 y Figura 4.6-5). Asimismo, no se detectó ningún olor desagradable que pudiera provocar rechazo o que pudiera indicar una alteración química de algún componente de la tinta, con los consiguientes efectos terapéuticos que pudieran aparecer.

Los parámetros de impresión configurados mediante el programa de laminado (recopilados en la Tabla 4.6-1 anterior) determinaron aspectos de la apariencia final de la figura tales como el nivel de detalle o la suavidad de la superficie. Los modelos más simples y con una superficie final plana (disco, corazón) presentaban un acabado homogéneo y suave únicamente si la capa superior estaba configurada como sólida (densidad de relleno del

100%), como era el caso del disco. En el caso del corazón, la capa superior estaba configurada con un relleno del 80%, hecho que empeoró notablemente el aspecto del acabado. Por otro lado, la configuración de una capa sólida superior no fue relevante en los ositos, con un mayor nivel de detalle en las capas finales. La reducción de la altura de la capa en este modelo permitió obtener una mayor definición de la figura y la mayor apreciación de elementos en la misma, como las orejas o el hocico del osito.

Paralelamente, es importante remarcar que las *drugmies* impresas a partir del mismo modelo 3D resultaron visualmente idénticas, hasta el punto de que cualquier posible defecto o marca derivada del proceso de impresión apareció por igual en todas las figuras. De esa forma, las dosificaciones en forma de osito de goma impresas con diferente densidad de relleno (80% vs 65%) también resultaron difíciles de identificar a primera vista pero, como era de esperar, diferían en masa y manipulabilidad, siendo mayores en las figuras más densas (Figura 4.6-6).



Figura 4.6-6. Detalle de osito con densidad de relleno al 65% (dcha.) y al 80% (izda.).

Para valorar de forma más precisa la fidelidad de forma, se cogieron 10 *drugmies* aleatorias de cada modelo impresas y se midieron sus dimensiones con un calibre. Todas las dosis orales de goma impresas reprodujeron los modelos 3D con una fidelidad notablemente alta, ya que los tamaños proyectados y medidos eran prácticamente iguales (Tabla 4.6-6). La mayor desviación en todos los casos corresponde a la altura, siendo la real menor a la estimada por culpa del efecto de la gravedad en la deposición de los hidrogeles. Al tratarse de productos semisólidos y con limitada rigidez, tienden a perder tamaño en su eje Z a medida que se depositan las capas.

Tabla 4.6-6. Dimensiones estimadas y reales de los cuatro modelos de *drugmies* impresos

Modelo 3D	Tamaño estimado (mm)	Longitud real (mm) \pm SD	Amplitud real (mm) \pm SD	Altura real (mm) \pm SD
Disco	15,0x15,0x4,5	15,01 \pm 0,01	15,00 \pm 0,00	4,27 \pm 0,07
Corazón	19,6x16,5x3,0	19,59 \pm 0,04	16,45 \pm 0,06	2,94 \pm 0,07
Osito 80%	20,8x11,2x7,8	20,56 \pm 0,06	10,97 \pm 0,05	7,44 \pm 0,08
Osito 65%	20,8x11,2x7,8	20,44 \pm 0,08	10,98 \pm 0,04	7,42 \pm 0,08



Figura 4.6-7. Detalle del procedimiento de medida con calibre de la longitud de las figuras impresas con F1.

El proceso de retirada de las *drugmies* del soporte de impresión se realizó de forma sencilla en todos los casos, sin que ninguna figura se rompiera o deshiciera. Sin embargo, resultó todavía más sencillo y rápido en tintas con almidón de maíz en su composición, como era de esperar, debido a la mayor resistencia mecánica de estas tintas revelada en pruebas reológicas. En general, antes de retirar las piezas impresas, solo fue necesaria una espera mínima (un par de minutos tras finalizar el proceso de impresión), de modo que se garantizase la solidificación completa de la tinta en toda la figura.

Todas las *drugmies*, una vez frías, pudieron ser manipuladas sin problemas. La manipulabilidad se probó de manera sencilla, por un lado, verificando si las figuras permanecían intactas cuando se agarraban para imitar el gesto de la toma y, por otro lado, si podían manipularse durante un mayor tiempo sin dejar restos en las manos, que pudieran conducir a una pérdida del contenido de la dosis del fármaco. En este caso, en las figuras con menor densidad de relleno (osito 65%) se produjo delaminación tras una manipulación prolongada —y excesiva en la práctica— del producto (Figura 4.6-8).

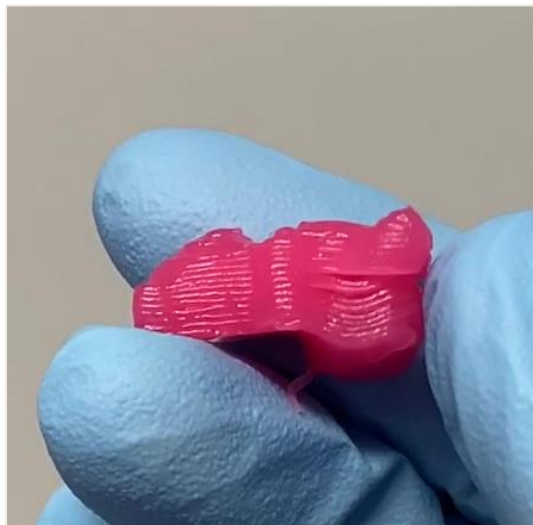


Figura 4.6-8. Delaminación tras manipulación prolongada en figura de baja densidad de relleno.

4.6.3. Ensayo de Uniformidad de Masa

Dentro del análisis de la Uniformidad de Unidades de Dosificación (UUD), el primero a realizar es la evaluación de la uniformidad de masa de las unidades posológicas, es decir, que la masa de todas las *drugmies* dentro de un lote (misma fórmula, modelo 3D y parámetros de impresión) sea el mismo.

Asumiendo que la concentración (cantidad del principio activo por unidad de dosificación) es uniforme, este análisis permite llevar a cabo la valoración del principio activo en una muestra representativa del lote producido. En otras palabras, se asume que, siendo uniforme la distribución de principio activo en todos los *drugmies*, si la masa de las figuras es la misma, las dosis contenidas también lo serán.

La Farmacopea Europea recoge este tipo de ensayo para dosis unitarias y establece unos porcentajes de desviación aceptables en función de la masa del comprimido (Tabla 4.6-7). Para cumplir con el ensayo, no más de dos unidades se pueden desviar un porcentaje mayor del especificado, y ninguna puede hacerlo más del doble.³¹⁰

Tabla 4.6-7. Porcentaje (%) de desvío establecido por la Farmacopea Europea.

Masa promedio del comprimido	80 mg o menos	Entre 80 y 250 mg	Más de 250 mg
% de desvío aceptado	10,0	7,5	5,0

Materiales y métodos

Para probar la uniformidad de masa independientemente del diseño 3D elegido, se imprimieron veinte figuras de cada modelo 3D (disco, corazón, osito 80% y osito 65%) utilizando la misma fórmula F1, y se pesaron individualmente utilizando una balanza de precisión digital (FH-200, GRAM, España). Por otro lado, para corroborar que la uniformidad de masa tampoco dependía de la tinta utilizada, se imprimieron veinte figuras más con cada una de las tintas F2, F3 y F4, con un modelo 3D diferente (corazón, osito 80% y osito 65%, respectivamente) en cada caso. Se eligieron cartuchos (jeringas) diferentes y aleatorios dentro del mismo lote de tinta para imprimir las figuras.

Siguiendo los procedimientos técnicos de la Farmacopea Europea, primeramente, se determinó la masa promedio de las veinte unidades a valorar y, a continuación, se verificaron las desviaciones de masa individuales en base a la monografía. Debido a que las *drugmies* tienen una masa superior a los 250 mg, el criterio de aceptación es de una desviación del 5%. Finalmente, se evaluó el cumplimiento del ensayo para cada combinación fórmula – modelo de forma individual, teniendo en cuenta que la prueba resulta fallida si más de dos unidades tienen una masa que se desvíe en más del 5% de la masa promedio y/o si la masa de un comprimido se desviaba en más del 10% del promedio.

Resultados

Uniformidad de masa con independencia del diseño 3D elegido

Las masas individuales de las figuras impresas con F1 y los valores de masa límite calculados para realizar el ensayo se muestran en la Tabla 4.6-8.

Tabla 4.6-8. Masas individuales de las *drugmies* (F1), promedios y límites calculados.

Disco				Corazón			
Figura	Masa (g)	Figura	Masa (g)	Figura	Masa (g)	Figura	Masa (g)
1	0,837	11	0,837	1	0,616	11	0,602
2	0,831	12	0,841	2	0,615	12	0,624
3	0,835	13	0,839	3	0,601	13	0,608
4	0,833	14	0,834	4	0,627	14	0,621
5	0,830	15	0,829	5	0,606	15	0,620
6	0,828	16	0,837	6	0,626	16	0,614
7	0,837	17	0,837	7	0,600	17	0,605
8	0,831	18	0,830	8	0,629	18	0,612

9	0,839	19	0,838	9	0,613	19	0,600
10	0,837	20	0,836	10	0,634	20	0,624
Masa promedio (\bar{X})	Límite superior ($(\bar{X}) + 5\%$)	Límite inferior ($(\bar{X}) - 5\%$)		Masa promedio (\bar{X})	Límite superior ($(\bar{X}) + 5\%$)	Límite inferior ($(\bar{X}) - 5\%$)	
0,835g	0,877g	0,793g		0,615g	0,646g	0,584g	
Osito 80%				Osito 65%			
Figura	Masa (g)	Figura	Masa (g)	Figura	Masa (g)	Figura	Masa (g)
1	1,244	11	1,236	1	1,130	11	1,131
2	1,230	12	1,232	2	1,128	12	1,131
3	1,232	13	1,243	3	1,134	13	1,129
4	1,235	14	1,249	4	1,122	14	1,134
5	1,235	15	1,237	5	1,131	15	1,122
6	1,227	16	1,252	6	1,139	16	1,140
7	1,236	17	1,253	7	1,131	17	1,141
8	1,232	18	1,237	8	1,129	18	1,136
9	1,245	19	1,248	9	1,135	19	1,124
10	1,244	20	1,225	10	1,130	20	1,131
Masa promedio (\bar{X})	Límite superior ($(\bar{X}) + 5\%$)	Límite inferior ($(\bar{X}) - 5\%$)		Masa promedio (\bar{X})	Límite superior ($(\bar{X}) + 5\%$)	Límite inferior ($(\bar{X}) - 5\%$)	
1,238g	1,300g	1,176g		1,131g	1,188g	1,075g	

La Tabla 4.6-9 muestra la calificación de la prueba para cada modelo 3D siguiendo el criterio de aceptación: no más de 2 de las masas individuales se desvían de la masa promedio en más del 5 por ciento y ninguna se desvía más del doble de ese porcentaje.

Tabla 4.6-9. Calificación de la prueba para cada modelo 3D impreso con F1.

F1 - [R(-)CS(+)]	Disco	Corazón	Osito 80%	Osito 65%
¿Cumple con el ensayo?	Sí	Sí	Sí	Sí

Con estos resultados, se puede afirmar que las dosis impresas cumplen con la prueba de uniformidad masiva independientemente del modelo 3D seleccionado, lo que justifica la amplia versatilidad y libertad de diseño de la metodología de impresión, pudiendo personalizar el diseño del producto en función del gusto o de los requerimientos del paciente.

Uniformidad de masa con independencia de la formulación utilizada

Las masas individuales y los valores límite calculados para realizar el ensayo se muestran en la Tabla 4.6-10.

Tabla 4.6-10. Masas individuales de las drugmies (F2 – F4), promedios y límites calculados.

F2 - Corazón				F3 - Osito 80%			
Figura	Masa (g)	Figura	Masa (g)	Figura	Masa (g)	Figura	Masa (g)
1	0,768	11	0,779	1	1,290	11	1,291
2	0,748	12	0,780	2	1,294	12	1,289
3	0,775	13	0,776	3	1,286	13	1,284
4	0,771	14	0,778	4	1,285	14	1,287
5	0,774	15	0,781	5	1,285	15	1,280
6	0,769	16	0,776	6	1,287	16	1,290
7	0,773	17	0,765	7	1,288	17	1,294
8	0,776	18	0,777	8	1,280	18	1,294
9	0,776	19	0,779	9	1,284	19	1,292
10	0,776	20	0,777	10	1,288	20	1,284
Masa promedio (\bar{X})	Límite superior $((\bar{X}) + 5\%)$	Límite inferior $((\bar{X}) - 5\%)$		Masa promedio (\bar{X})	Límite superior $((\bar{X}) + 5\%)$	Límite inferior $((\bar{X}) - 5\%)$	
0,774	0,812	0,735		1,288	1,352	1,223	
F4 - Osito 65%							
Figura	Masa (g)	Figura	Masa (g)				
1	1,119	11	1,119				
2	1,127	12	1,128				
3	1,123	13	1,134				
4	1,126	14	1,137				
5	1,123	15	1,134				
6	1,117	16	1,137				
7	1,117	17	1,117				
8	1,122	18	1,131				
9	1,121	19	1,128				
10	1,130	20	1,129				
Masa promedio (\bar{X})	Límite superior $((\bar{X}) + 5\%)$	Límite inferior $((\bar{X}) - 5\%)$					
1,126	1,182	1,070					

La Tabla 4.6-11 muestra la calificación de la prueba para cada modelo 3D siguiendo el criterio de aceptación: no más de 2 de las masas individuales se desvían de la masa promedio en más del 5 por ciento y ninguna se desvía más del doble de ese porcentaje.

Tabla 4.6-11. Calificación de la prueba para cada modelo 3D impreso con una tinta diferente.

	F2 - corazón	F3 - osito 80%	F4 - osito 65%
¿Cumple con el ensayo?	Sí	Sí	Sí

Tras este ensayo, se puede concluir que las dosis impresas gomosas también cumplen con la prueba de uniformidad de masa independientemente de la tinta utilizada, lo que permite la formulación de nuevas tintas con distintas composiciones y/o ingredientes activos e imprimir dosis gomosas uniformes con seguridad. Nuevamente, se pone en valor la versatilidad de la metodología de impresión 3D como una forma de fabricar dosis personalizadas con alta libertad de productos de partida.

4.6.4. Ensayo de Uniformidad de Contenido

El ensayo de Uniformidad de Contenido se basa en la valoración individual del contenido de principio activo o principios activos en un número de unidades de dosificación, a fin de determinar si los contenidos individuales se encuentran dentro de los límites establecidos, con referencia al contenido medio de la muestra.³¹¹ Aunque se emplee el ensayo de Uniformidad de Masa, en caso de controversia el producto deberá cumplir con el ensayo oficial de Uniformidad de Contenido.

En este caso, para valorar la relación entre la cantidad de principio activo esperado de forma teórica y el real obtenido, se recurrió al capítulo 2.9.6. *Uniformidad de contenido* de la 6ª Edición de la Farmacopea Europea:

“Salvo indicación en contra o excepción justificada y autorizada, los comprimidos cuyo contenido de principio activo sea inferior a 2 mg, o menor que el 2 por ciento de la masa total, satisfacen el ensayo A de uniformidad de contenido para las preparaciones unidosis. Si la preparación contiene varios principios activos, el requisito sólo se aplica a aquéllos que corresponden a las condiciones indicadas anteriormente”.

Conociendo que el valor teórico de principio activo en las *drugmies* es superior a 2mg y mayor del 2% de la masa total, se le aplica el criterio del ensayo B de uniformidad de contenido:

“La preparación cumple con el ensayo si no más de un contenido individual está fuera de los límites del 85% al 115% del contenido promedio y ninguno está fuera de los límites del 75% al 125% del contenido promedio. La preparación no cumple con la prueba si más de tres contenidos individuales están fuera de los límites de 85% a 115% del contenido promedio o si uno o más contenidos individuales están fuera de los límites de 75% a 125% del contenido promedio. Si 2 o 3 contenidos individuales están fuera de los límites del 85% al 115% pero dentro de los límites del 75% al 125%, se deben determinar los contenidos individuales de otras 20 unidades de dosificación tomadas al azar. La preparación cumple con la prueba si no más de 3 contenidos individuales de las 30 unidades están fuera de los límites del 85% al 115% del contenido promedio y ninguno está fuera de los límites del 75% al 125% por ciento del contenido promedio.”

Materiales y métodos

La determinación del contenido individual de principio activo se realizó mediante un método analítico adecuado al clorhidrato de ranitidina: la espectrofotometría UV-Vis (Agilent Cary 60 UV-Vis, Agilent, Reino Unido). En la formulación de estos lotes, no se incluyeron colorantes alimentarios para asegurar una cuantificación adecuada y sin posibilidad de interferencia con grupos cromóforos ajenos al principio activo. Se eligieron diferentes jeringas aleatorias dentro del mismo lote para imprimir cada una de las figuras.

En primer término, se preparó una curva de calibración de clorhidrato de ranitidina a partir de siete diluciones (D1-D7) de una solución madre preparada con 10mg de principio activo puro comercial (Fagrón, España) en 100ml de agua desionizada, obtenidas al transferir distintas alícuotas a matraces volumétricos y diluyéndolos hasta el enrase con agua desionizada. Una de las diluciones (D6, 16 μg / ml) se escaneó entre 200 y 400nm para detectar el valor de la λ_{max} : la longitud de onda en la cual se produce el máximo de absorbancia en el espectro para una sustancia determinada.

Para evaluar el contenido de ranitidina de los fármacos, cada unidad se pesó y diluyó en agua desionizada en un matraz aforado de 500 ml, justo después de ser impresa. El matraz se mantuvo en un baño a 37 °C con agitación magnética (850 rpm) hasta que la dosis gomosa se disolvió completamente. Posteriormente, se diluyó una alícuota filtrada de 1 ml

en 20 ml de agua desionizada y se midió a λ_{\max} para determinar la concentración de ranitidina. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

Resultados

El barrido de longitud de onda dio lugar al espectro del clorhidrato de ranitidina con el pico de mayor intensidad o λ_{\max} a 313,0 nm (Figura 4.6-9), que coincide con el valor descrito en la bibliografía.³¹² Midiendo por triplicado la absorbancia en λ_{\max} de las diluciones D1-D7, se obtuvo la curva de calibración correspondiente, con un coeficiente de correlación $R^2= 0,9999$ (Tabla 4.6-12).

Tabla 4.6-12. Lectura de la absorbancia de las diluciones y curva de calibrado calculada.

Dilución	Concentración mg/L	Lectura promedio	SD	Lecturas
D1	0,5	0,0310	0,00006	0,0310
				0,0309
				0,0310
D2	1	0,0513	0,00006	0,0513
				0,0513
				0,0512
D3	2	0,0985	0,00012	0,0984
				0,0986
				0,0986
D4	4	0,1853	0,00026	0,1855
				0,1854
				0,1850
D5	8	0,3675	0,00017	0,3677
				0,3674
				0,3674
D6	16	0,6951	0,00017	0,6950
				0,6953
				0,6950
D7	32	1,3827	0,00069	1,3823
				1,3835
				1,3823
Curva de calibrado:		$Abs = 0,0428 * Conc + 0,0130$		$R^2 = 0,9999$

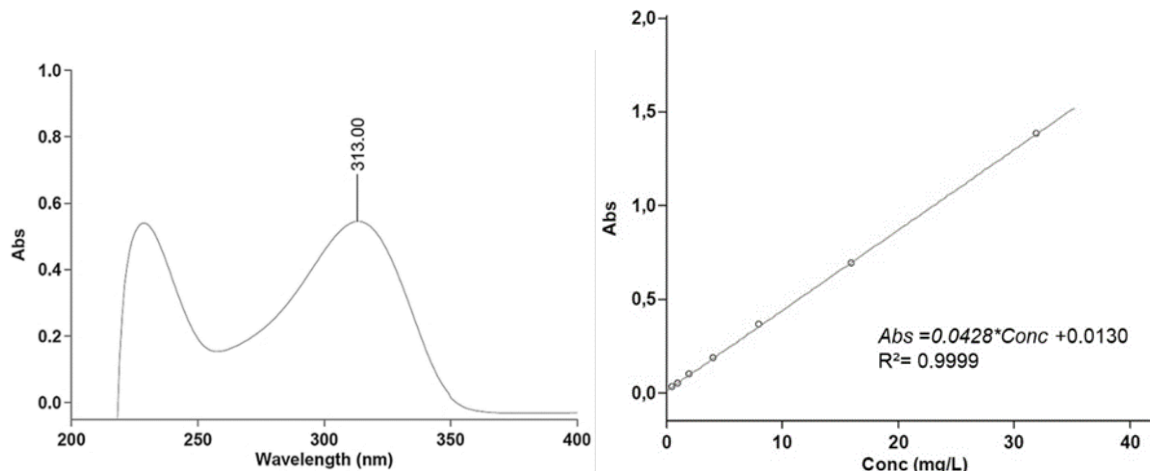


Figura 4.6-9. Detección de λ_{max} y representación gráfica de la curva de calibrado.

Del mismo modo, para detectar la cantidad de ranitidina contenida en cada unidad posológica, se midió la absorbancia del medio resultante de la disolución de cada *drugmie* en agua destilada.

Para poder calcular la dosis exacta presente en cada figura impresa, se requiere conocer la concentración teórica de ranitidina en cada fórmula, al ser éstas ligeramente distintas en su composición y preparación (F2, con almidón, y F4, sin almidón):

$$F2 [ranitidina HCl] = \frac{1.004 \text{ mg ranitidina HCl}}{25 \text{ g tinta final}} = 40,16 \text{ mg ranitidina HCl/g tinta}$$

$$F4 [ranitidina HCl] = \frac{1.004 \text{ mg ranitidina HCl}}{28,5 \text{ g tinta final}} = 35,23 \text{ mg ranitidina HCl/g tinta}$$

En la práctica, para las tintas con almidón, se perdió aproximadamente el 15% de la masa total por la evaporación del agua en el proceso de gelificación del almidón. En cambio, para las tintas sin almidón, la pérdida de masa fue de aproximadamente un 5%. Por este motivo, la concentración de principio activo resulta ligeramente superior en el caso de F2. Conocer las concentraciones finales es imprescindible para poder determinar qué cantidad de ranitidina hay en cada *drugmie* analizada. Las tablas Tabla 4.6-13 y Tabla 4.6-14 siguientes contienen los cálculos realizados para deshacer los factores de dilución y determinar los mg de principio activo en cada unidad posológica necesarios para el análisis de su uniformidad.

Tabla 4.6-13. Contenido en ranitidina de las drugmies impresas con la fórmula F2.

Nº Fig.	Masa figura (g)	Conc. tinta (mg/g)	Dosis esperada (mg)	Abs	Abs promedio	Conc. muestra (mg/g)	Dosis medida (mg)	% Dosis objetivo
A1	0,803	40,16	32,25	0,1484 0,1483 0,1486	0,1484	39,37	31,61	98,03
A2	0,799	40,16	32,09	0,1435 0,1438 0,1440	0,1438	38,20	30,52	95,13
A3	0,803	40,16	32,25	0,1496 0,1496 0,1499	0,1497	39,74	31,91	98,95
A4	0,799	40,16	32,09	0,1450 0,1454 0,1457	0,1454	38,67	30,90	96,29
A5	0,798	40,16	32,05	0,1484 0,1487 0,1489	0,1487	39,68	31,67	98,82
A6	0,799	40,16	32,09	0,1574 0,1578 0,1579	0,1577	42,27	33,78	105,26
A7	0,801	40,16	32,17	0,1604 0,1604 0,1608	0,1605	42,99	34,44	107,06
A8	0,804	40,16	32,29	0,1516 0,1516 0,1520	0,1517	40,28	32,38	100,30
A9	0,802	40,16	32,21	0,1508 0,1505 0,1505	0,1506	40,05	32,12	99,72
A10	0,804	40,16	32,29	0,1508 0,1506 0,1504	0,1506	39,95	32,12	99,48
Promedio	0,801	-	-	-	-	-	32,15	99,90
SD	0,002	-	-	-	-	-	1,19	3,68

Tabla 4.6-14. Contenido en ranitidina de las drugmies impresas con la fórmula F4.

Nº Fig.	Masa figura (g)	Conc. tinta (mg/g)	Dosis esperada (mg)	Abs	Abs promedio	Conc. muestra (mg/g)	Dosis detectada (mg)	% Dosis objetivo
NA1	0,804	35,23	28,32	0,13234 0,13245 0,13226	0,1324	34,65	27,86	98,36
NA2	0,801	35,23	28,22	0,12423 0,12412 0,12433	0,1242	32,41	25,96	92,01
NA3	0,798	35,23	28,11	0,13075 0,13054 0,13077	0,1307	34,43	27,47	97,72
NA4	0,799	35,23	28,15	0,12745 0,12741 0,12713	0,1273	33,40	26,69	94,81
NA5	0,804	35,23	28,32	0,11189 0,11196 0,11210	0,1120	28,74	23,11	81,58
NA6	0,800	35,23	28,18	0,11882 0,11890 0,11904	0,1189	30,91	24,72	87,73
NA7	0,805	35,23	28,36	0,13191 0,13203 0,13190	0,1319	34,49	27,77	97,91
NA8	0,800	35,23	28,18	0,12557 0,12555 0,12576	0,1256	32,86	26,29	93,29
NA9	0,805	35,23	28,36	0,12377 0,12357 0,12382	0,1237	32,11	25,85	91,14
NA10	0,803	35,23	28,29	0,12722 0,12711 0,12719	0,1272	33,19	26,65	94,21
Promedio	0,802	-	-	-	-	-	26,24	92,88
SD	0,003	-	-	-	-	-	1,43	5,11

Una vez determinado el contenido de cada una de las *drugmies* analizadas y calculado el contenido o dosis promedio para las unidades impresas con cada fórmula, se llevó a cabo el análisis de la uniformidad siguiendo el criterio previamente especificado.

Tabla 4.6-15. Cálculo del porcentaje de dosis sobre la dosis promedio para la valoración de la Uniformidad de Contenido.

F2 - R(+) CS(+)				F4 - R(+) CS(-)			
Nº Fig.	Dosis medida (mg)	Dosis promedio (mg)	% sobre dosis promedio	Nº Fig.	Dosis medida (mg)	Dosis promedio (mg)	% sobre dosis promedio
A1	31,61	32,15	98,35	NA1	27,86	26,24	106,19
A2	30,52	32,15	94,96	NA2	25,96	26,24	98,96
A3	31,91	32,15	99,27	NA3	27,47	26,24	104,71
A4	30,90	32,15	96,12	NA4	26,69	26,24	101,72
A5	31,67	32,15	98,52	NA5	23,11	26,24	88,07
A6	33,78	32,15	105,08	NA6	24,72	26,24	94,24
A7	34,44	32,15	107,13	NA7	27,77	26,24	105,83
A8	32,38	32,15	100,74	NA8	26,29	26,24	100,20
A9	32,12	32,15	99,92	NA9	25,85	26,24	98,51
A10	32,12	32,15	99,92	NA10	26,65	26,24	101,58

*En *negrita*, los porcentajes máximo y mínimo de cada fórmula.

Del análisis de los resultados se puede extraer que la precisión de la dosis fue exitosa, pues todos los porcentajes de dosis objetivo detectados superaban el 80%. Por otro lado, la uniformidad del contenido de los dos lotes examinados cumplió ampliamente con los estándares marcados, ya que el rango de contenido medido estuvo, en ambas tintas, dentro del 85-115% marcado por la monografía general.

4.6.5. Ensayo de disolución

La disolución es el proceso en el que una sustancia determinada forma una solución. De ese modo, el Test de Disolución es un ensayo que mide el grado y la velocidad de formación de una solución a partir de una forma de dosificación concreta, como puede ser un comprimido, una cápsula, un ungüento, etc. Los estudios de disolución se utilizan

comúnmente para simular el comportamiento *in vitro* de las dosis farmacéuticas y predecir su biodisponibilidad y eficacia.³¹³ Es importante mencionar que los términos “disolución” y “liberación del fármaco” se usan indistintamente para hacer referencia a este proceso.

Para evaluar adecuadamente la disolución de los productos farmacéuticos, es fundamental que los procedimientos estén estandarizados. Esta estandarización ayuda a mostrar una calidad constante en la producción y puede servir como una medida predictiva de eficacia.³¹⁴ Para la realización de estos ensayos se emplean unos aparatos estandarizados y propios, con unas condiciones de análisis concretas y un criterio de aceptación final que evalúa el rendimiento del producto. Los aparatos utilizados más comúnmente son los disolutores de canastillas (Aparato 1 o USP-I) y de paletas (Aparato 2 o USP-II), al ser sencillos, robustos y lo suficientemente flexibles como para permitir la realización de pruebas de disolución para una alta variedad de productos medicinales. Por este motivo, salvo que se pruebe que los aparatos 1 o 2 no son satisfactorios para una forma farmacéutica concreta, no se suelen emplear otros procedimientos de disolución *in vitro* descritos en la USP.³¹⁵

En el caso de las *drugmies*, al no existir un ensayo específico para las dosis masticables, se utilizó el método contenido en la monografía de la USP para comprimidos de ranitidina (USP 43-NF 38), que establece que no menos del 80% de la cantidad contenida de ranitidina debe disolverse en 45 min.

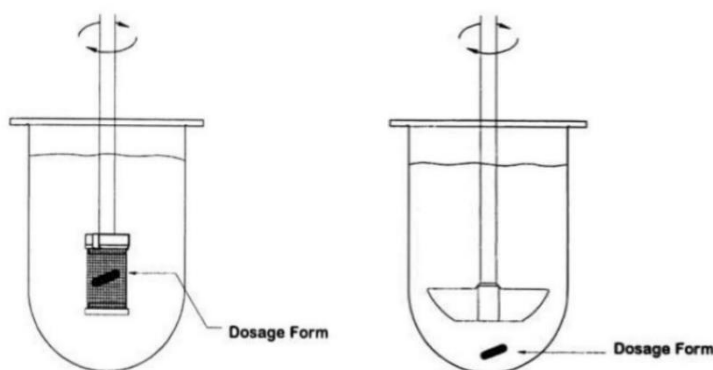


Figura 4.6-10. Esquema de los aparatos de disolución tipo 1 (izda.) y tipo 2 (dcha.).

Materiales y métodos

Para la realización de este ensayo, los perfiles de liberación se determinaron con un aparato tipo USP-II modelo Erweka D700 (Figura 4.6-11), propiedad del departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona que,

además, participó en la planificación del ensayo, su ejecución y la discusión de los resultados extraídos.



Figura 4.6-11. Aparato tipo USP-II estandarizado empleado para el estudio de liberación.

Se seleccionaron 6 *drugmies* impresas con F2 y F4. Cada unidad posológica se colocó en un recipiente del aparato con agua purificada como medio de disolución (900 ml), mantenido a la temperatura del ensayo a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con una velocidad de agitación de 50 rpm. Se tomaron muestras del medio de disolución (10 ml) a los 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min; y se determinó la cantidad de ranitidina disuelta mediante espectrofotometría UV-Vis. Nuevamente, no se incluyó colorante alimentario en la formulación de estos lotes de tinta para asegurar una cuantificación adecuada de ranitidina. Se emplearon el mismo modelo 3D (disco) y los mismos parámetros de impresión en todas las *drugmies* sometidas al ensayo de disolución. De ese modo, cualquier desviación en los resultados no podría ser derivada de ninguna diferencia en el proceso de impresión o en el propio diseño 3D y habría de atribuirse a la composición formulada en cada caso.

Resultados

A partir de las absorbancias determinadas en los distintos tiempos de muestreo y de la recta de calibración determinada para este ensayo ($\text{Abs}=0,0443 \cdot \text{Conc} - 0,0029$), se pudo llevar a cabo el cálculo de las cantidades de ranitidina liberada correspondientes para cada fórmula (Tabla 4.6-16 para F2 y Tabla 4.6-17 para F4), procediéndose a la elaboración de una representación gráfica de los perfiles de disolución obtenidos (Figura 4.6-12 y Figura 4.6-13, respectivamente).

Tabla 4.6-16. Absorbancias detectadas y porcentajes de ranitidina HCl liberada calculados para las drugmies fabricadas con la fórmula F2.

Vaso 1					Vaso 2					Vaso 3				
T (min)	Abs	Conc. (µg/mL)	mg API	% API Liberado	T (min)	Abs	Conc. (µg/mL)	mg API	% API Liberado	T (min)	Abs	Conc. (µg/mL)	mg API	% API Liberado
5	0,3061	6,84	6,16	29,20	5	0,2552	5,69	5,12	24,91	5	0,3341	7,47	6,73	31,98
10	0,3928	8,80	7,92	37,55	10	0,4074	9,13	8,21	39,94	10	0,4551	10,20	9,18	43,66
15	0,4358	9,77	8,79	41,69	15	0,4170	9,34	8,41	40,89	15	0,519	11,64	10,48	49,83
30	0,5778	12,97	11,67	55,36	30	0,5584	12,53	11,28	54,85	30	0,6852	15,39	13,85	65,88
45	0,6406	14,39	12,95	61,41	45	0,6286	14,12	12,70	61,78	45	0,7423	16,68	15,01	71,39
60	0,7961	17,89	16,11	76,38	60	0,7642	17,17	15,46	75,17	60	0,8862	19,93	17,93	85,29
90	0,8757	19,69	17,72	84,05	90	0,8472	19,05	17,14	83,36	90	0,9699	21,82	19,63	93,37
120	0,9071	20,40	18,36	87,07	120	0,9333	20,99	18,89	91,86	120	1,0167	22,87	20,58	97,89

Vaso 4					Vaso 5					Vaso 6				
T (min)	Abs	Conc. (µg/mL)	mg API	% API Liberado	T (min)	Abs	Conc. (µg/mL)	mg API	% API Liberado	T (min)	Abs	Conc. (µg/mL)	mg API	% API Liberado
5	0,2354	5,25	4,72	22,83	5	0,3361	7,52	6,77	32,05	5	0,2781	6,21	5,59	26,18
10	0,3751	8,40	7,56	36,55	10	0,3667	8,21	7,39	34,99	10	0,3601	8,06	7,25	33,98
15	0,4068	9,11	8,20	39,66	15	0,436	9,77	8,79	41,66	15	0,4477	10,03	9,03	42,31
30	0,5213	11,70	10,53	50,90	30	0,6037	13,55	12,20	57,78	30	0,5829	13,08	11,78	55,17
45	0,6225	13,98	12,58	60,84	45	0,6782	15,23	13,71	64,95	45	0,7109	15,97	14,38	67,35
60	0,6725	15,11	13,60	65,75	60	0,7501	16,86	15,17	71,86	60	0,7835	17,61	15,85	74,26
90	0,7902	17,76	15,99	77,30	90	0,8305	18,67	16,80	79,60	90	0,8985	20,20	18,18	85,20
120	0,8903	20,02	18,02	87,13	120	0,8967	20,16	18,15	85,96	120	0,992	22,31	20,08	94,09

Tabla 4.6-17. Absorbancias detectadas y porcentajes de ranitidina HCl liberada calculados para las drugmies fabricadas con la fórmula F4.

Vaso 1					Vaso 2					Vaso 3				
T (min)	Abs	Conc. (µg/mL)	mg API	% API Liberado	T (min)	Abs	Conc. (µg/mL)	mg API	% API Liberado	T (min)	Abs	Conc. (µg/mL)	mg API	% API Liberado
5	0,6276	14,09	12,68	53,44	5	0,6081	13,65	12,29	52,11	5	0,8555	19,23	17,31	74,58
10	0,9928	22,33	20,10	84,69	10	0,8591	19,32	17,38	73,72	10	1,1753	26,45	23,80	102,55
15	1,1771	26,49	23,84	100,45	15	1,2016	27,04	24,34	103,20	15	1,1698	26,32	23,69	102,07
30	1,1972	26,94	24,25	102,17	30	1,1994	26,99	24,29	103,01	30	1,1519	25,92	23,33	100,50
45	1,2114	27,27	24,54	103,40	45	1,1783	26,52	23,87	101,20	45	1,1723	26,38	23,74	102,29
60	1,2120	27,28	24,55	103,44	60	1,1804	26,56	23,91	101,38	60	1,1641	26,20	23,58	101,57
90	1,1999	27,00	24,30	102,40	90	1,1850	26,67	24,00	101,77	90	1,1632	26,18	23,56	101,49
120	1,1993	26,99	24,29	102,35	120	1,1832	26,63	23,96	101,62	120	1,1567	26,03	23,43	100,92

Vaso 4					Vaso 5					Vaso 6				
T (min)	Abs	Conc. (µg/mL)	mg API	% API Liberado	T (min)	Abs	Conc. (µg/mL)	mg API	% API Liberado	T (min)	Abs	Conc. (µg/mL)	mg API	% API Liberado
5	0,6771	15,21	13,69	58,27	5	0,8802	19,79	17,81	76,64	5	0,7620	17,13	15,41	65,55
10	0,9653	21,71	19,54	83,18	10	1,1201	25,20	22,68	97,60	10	1,1599	26,10	23,49	99,91
15	1,1287	25,40	22,86	97,30	15	1,1400	25,65	23,09	99,33	15	1,1644	26,20	23,58	100,30
30	1,1976	26,95	24,26	103,26	30	1,1625	26,16	23,54	101,30	30	1,1853	26,67	24,01	102,11
45	1,1653	26,22	23,60	100,47	45	1,1557	26,01	23,41	100,71	45	1,1652	26,22	23,60	100,37
60	1,2189	27,43	24,69	105,10	60	1,2063	27,15	24,43	105,13	60	1,2342	27,78	25,00	106,33
90	1,2075	27,18	24,46	104,12	90	1,1942	26,88	24,19	104,07	90	1,2105	27,24	24,52	104,28
120	1,1818	26,60	23,94	101,89	120	1,1603	26,11	23,50	101,11	120	1,1854	26,68	24,01	102,12

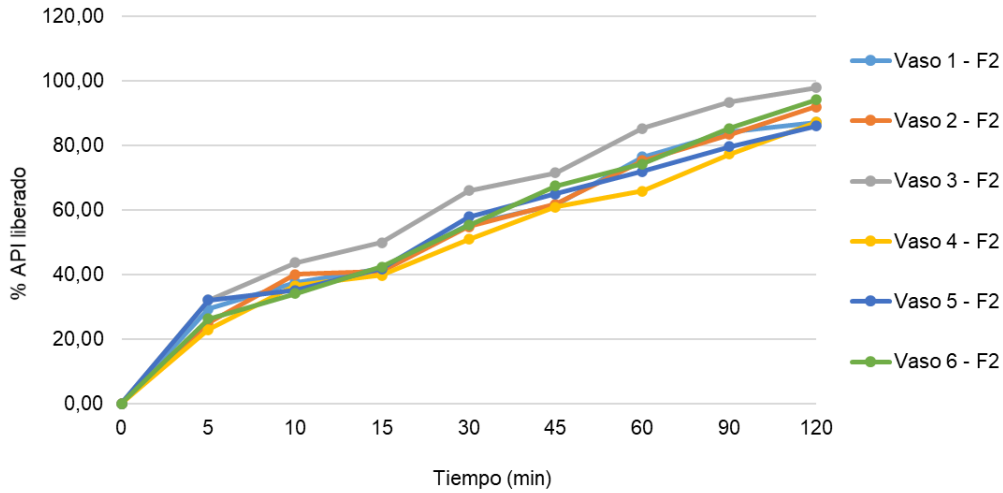


Figura 4.6-12. Perfil de disolución de las drugmies impresas con la fórmula F2.

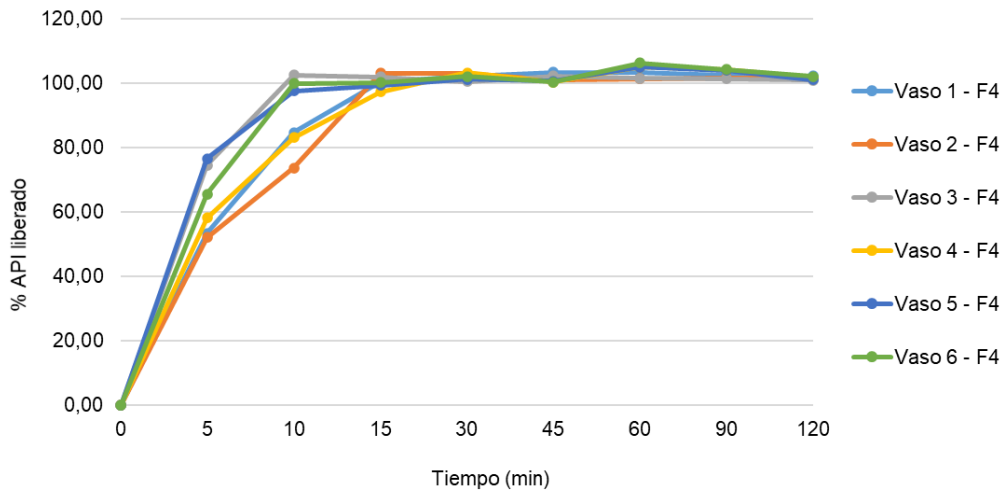


Figura 4.6-13. Perfil de disolución de las drugmies impresas con la fórmula F4.

Si se observa la comparativa entre ambos perfiles de liberación (Figura 4.6-14) se puede apreciar que, aunque ambas formulaciones liberaron prácticamente el 100% de su contenido después de 120 min, los perfiles de disolución resultantes fueron completamente diferentes. Por un lado, F4 (R (+) CS (-)) liberó rápidamente el API y se obtuvieron concentraciones cercanas al 100% a los 15 minutos, dando lugar a un perfil de liberación inmediato. Por otro lado, F2 (R (+) CS (+)) mostró una liberación más prolongada de ranitidina, logrando solo un 60% disuelto después de 45 minutos.

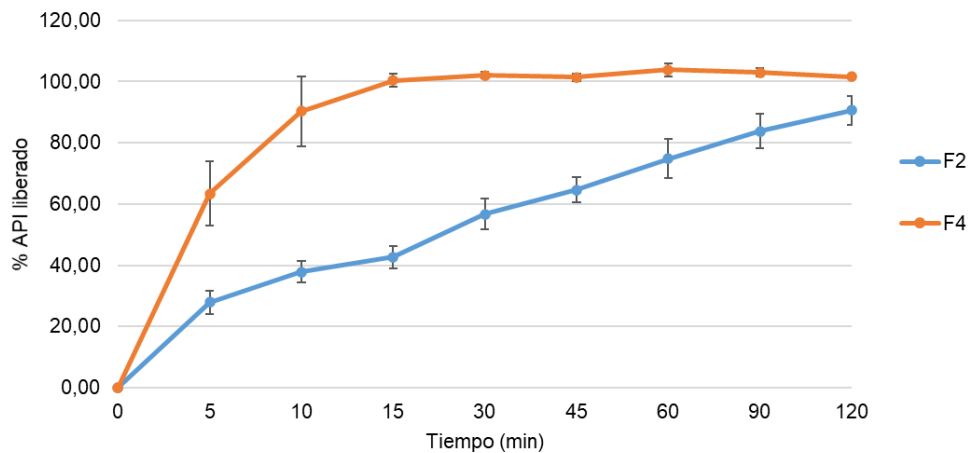


Figura 4.6-14. Gráfica comparativa de los perfiles de disolución de las drugmies impresas con F2 y F4.

Aunque el almidón de maíz generalmente se emplea en la formulación clásica de comprimidos debido a las propiedades desintegrantes,^{273,274} el proceso de gelatinización durante la elaboración de la tinta causó el efecto contrario. En este caso, el almidón gelatinizado formó una estructura de gel más compacta que actúa como una barrera más resistente a la liberación del fármaco, afectando el perfil de disolución.³¹⁶ De hecho, este efecto se aprecia claramente al observar los vasos del disolutor durante el Test de Disolución (Figura 4.6-15): mientras que las *drugmies* impresas con F4 desaparecen por completo a los 120 minutos de ensayo, en los vasos de las *drugmies* impresas con F2 en ese minuto todavía quedan restos de esa matriz de almidón gelatinizado con una mayor resistencia a la disolución.

En cuanto al cumplimiento de las especificaciones de la monografía USP seleccionada, para este ensayo, las tolerancias establecen que no menos del 80% de la cantidad contenida de ranitidina debe disolverse en 45 minutos. De este modo, F4 cumpliría ampliamente con el test, mientras que F2 no alcanzaría los niveles exigidos. Si bien es cierto que estas especificaciones están establecidas para comprimidos formulados para la liberación inmediata del principio activo, un perfil muy distinto al que se obtiene con F2.

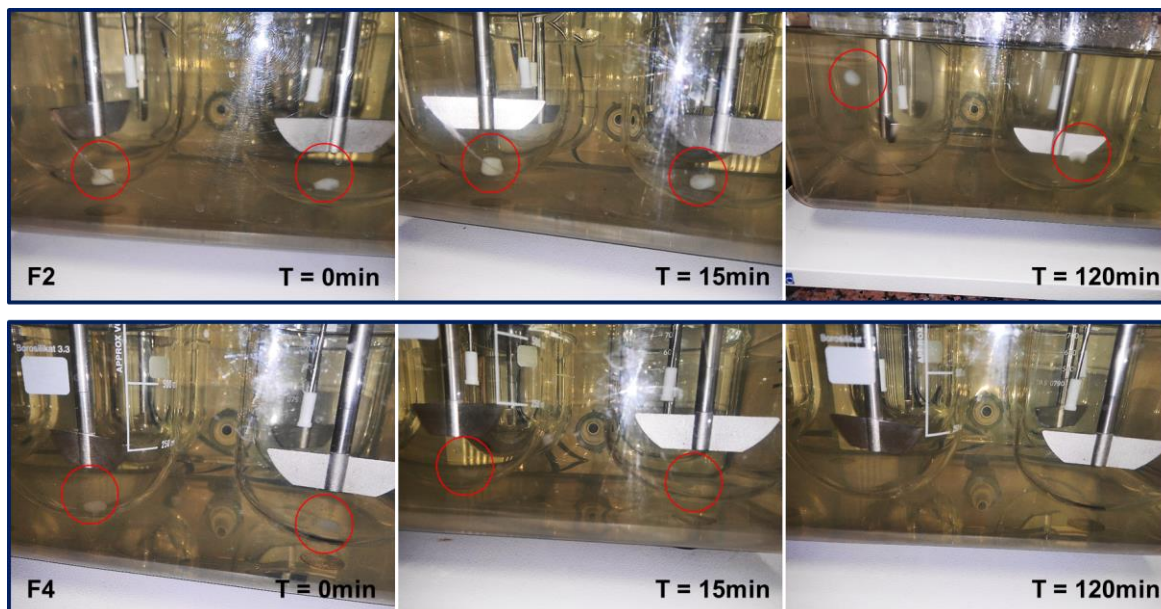


Figura 4.6-15. Imágenes del proceso de disolución de las drugmies dentro del aparato USP-II. Imágenes tomadas y cedidas por del departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Por ese motivo, esta tinta formulada supondría un nuevo enfoque en la dosificación personalizada, al obtenerse una forma farmacéutica de liberación modificada y controlada del fármaco. En este tipo de formas de liberación, el principio activo se libera escalonadamente en el tiempo (la velocidad de liberación es limitante en el proceso de absorción), alargándose el efecto terapéutico. Con ello, se cubren otras necesidades dentro del espectro de la dosificación personalizada, pues una liberación sostenida es altamente deseable para mantener las concentraciones plasmáticas dentro de los límites de efectividad y toxicidad en medicamentos con estrecho margen terapéutico (teofilina, litio...), para reducir los picos plasmáticos elevados asociados a efectos adversos en fármacos que se absorben rápidamente (como, por ejemplo, la taquicardia refleja o las oscilaciones en la tensión arterial tras la toma de nifedipino), o en fármacos de corta duración de acción que precisan varias tomas diarias (morfina).³¹⁷

4.7. Valoración del capítulo

En este capítulo se describe la creación de las “*drugmies*”, una forma farmacéutica alternativa obtenida por impresión 3D que, además de contener una dosis personalizada de principio activo, que pudiera tener una mejor aceptación en algunos sectores de la población más exigentes, como los niños. Para ello, además de combinar algunos diseños con formas más llamativas y mayor complejidad que las pastillas clásicas, se ha buscado mejorar el aspecto final de la dosificación para hacerla lo más atractiva posible, no solo mediante la adición de colorantes y esencias, sino también consiguiendo una fórmula de textura gomosa *post-impresión*, con un tacto y manipulabilidad aptas, y con un acabado pulido y brillante que las hiciera apetecibles.

La combinación de una serie de componentes base, comunes tanto en la industria alimenticia como en la farmacia galénica (gelatina de cerdo, almidón de maíz, goma xantana, carragenato iota), con excipientes auxiliares (edulcorantes, colorantes y esencias) y un principio activo (clorhidrato de ranitidina) ha dado lugar a las cuatro fórmulas finales con las que se han realizado los ensayos correspondientes.

Empleando la impresora 3D mediante extrusión de semisólidos de IDONIAL, se han podido imprimir con éxito los diferentes diseños introducidos con las tintas finales formuladas, gracias en parte al control preciso de la deposición de material y un software operativo adecuado. Además, el sistema de control de temperatura de los extrusores y de la plataforma de impresión ha permitido el aprovechamiento del comportamiento termosensible de las tintas para facilitar la impresión. De ese modo, por un lado, se ha reducido la viscosidad de estas aplicando calor a temperatura constante en la jeringa contenedora, y por el otro, se ha inducido una rápida gelificación in situ mediante la aplicación de frío en la plataforma de impresión, recuperando así el estado sólido de la tinta.

Las pruebas reológicas también han confirmado la idoneidad de las tintas para la tecnología de impresión 3D utilizada, pues tienen un claro comportamiento pseudoplástico y una adecuada recuperación de la viscosidad. En esa línea, las tintas con almidón en su composición han resultado más aptas al tener una reestructuración más rápida,

adquiriendo antes la resistencia mecánica necesaria para soportar la siguiente capa extruida y para retirar la figura del soporte de impresión cuando finaliza el proceso de fabricación. En este tipo de tintas, además, se amortiguó notablemente la presencia de clorhidrato de ranitidina y su efecto sobre el comportamiento de la tinta. Este hallazgo abre la posibilidad de estudiar el uso de esta fórmula como vehículo para la dosificación de otros principios activos, lo que facilitaría el manejo de la impresora para el usuario final y ahorraría tiempo al personal sanitario, debido a que los parámetros de impresión más adecuados ya estarían especificados y no tendrían que ser investigados.

Una vez impresas, las *drugmies* tienen una apariencia final que no difiere de la de una gominola de frutas convencional. El color es homogéneo y brillante, aspectos necesarios para una mayor aceptación por parte del paciente, pues una distribución no uniforme del mismo no solo podría llamar la atención desde el punto de vista estético, sino que también estaría asociada a una falta de uniformidad de contenido, una baja calidad de la dosificación o un proceso de deterioro. Todas las dosificaciones impresas han reproducido los modelos 3D con muy alta fidelidad y han cumplido cómodamente con los ensayos de Uniformidad de Masa y Uniformidad de Contenido, independientemente del modelo 3D seleccionado, consolidando la reproducibilidad del proceso para la fabricación de unidades de dosificación y asegurando la obtención de las dosis planificadas. Así pues, ajustar la dosis de clorhidrato de ranitidina al paciente se podría realizar de forma sencilla, con seguridad y fiabilidad, simplemente eligiendo un modelo 3D y su tamaño —un tamaño mayor, una dosis mayor— o variando la densidad de llenado de la figura, ya que una reducción del porcentaje de relleno conduce a una disminución en la masa final de la figura y, por lo tanto, a una menor cantidad de ingrediente activo. Por otro lado, los estudios de disolución han revelado diferentes perfiles de liberación del principio activo en función de la presencia o ausencia de almidón en la composición, obteniendo una liberación de ranitidina más rápida en fórmulas sin almidón y una liberación más lenta y prolongada al agregar almidón de maíz entre los componentes y permitir su gelificación durante el proceso de formulación. En esta línea, se podría desarrollar un nuevo enfoque y fabricar formas orales de liberación controlada impresas en 3D para determinados principios activos y/o patologías.

En resumen, a pesar de que la fabricación de las *drugmies* es todavía un enfoque experimental, los resultados obtenidos se ajustan perfectamente a las exigencias de unos estándares que solo reproducen las tecnologías de fabricación industrial. Llevándolo a un futuro entorno clínico, esta aplicación de la impresión 3D en la fabricación deslocalizada

de medicamentos dotará al personal sanitario de la capacidad de proporcionar una dosificación “paciente-específica” cambiando el diseño, la densidad de relleno o el tamaño de la figura impresa, evitando la elaboración de preparados oficinales clásicos y los errores comunes derivados de la dosificación de medicamentos líquidos en niños. Las *drugmies* pueden mejorar el cumplimiento y la adherencia al tratamiento a la vez que disminuyen el impacto emocional de la enfermedad, sobre todo entre los más pequeños.

4.8. Conclusiones

- La combinación de gelatina, goma xantana y carragenato iota en correctas proporciones genera tintas imprimibles mediante SSE aptas para la vehiculación y dosificación de principios activos.
- El empleo de las fórmulas investigadas para la impresión 3D de medicamentos da lugar a unidades posológicas que, además de contener una dosis precisa y repetible, tienen un aspecto y unas características organolépticas agradables.
- El clorhidrato de ranitidina utilizado como principio activo se encuentra en estado amorfo dentro de las tintas, forma necesaria para su correcta absorción y eficacia terapéutica.
- El perfil de disolución del medicamento puede modificarse mediante la adición de almidón a la formulación, el cual genera una matriz más cohesiva y provoca una liberación prolongada del principio activo, fenómeno de interés para el tratamiento de patologías que requieren concentraciones sostenidas de fármaco en el organismo.

Bibliografía

- (1) Whitaker, M. The History of 3D Printing in Healthcare. *Bull. R. Coll. Surg. Engl.* **2014**, *96* (7), 228–229. <https://doi.org/10.1308/147363514X13990346756481>.
- (2) Bonneau, V.; Yi, H.; Probst, L.; Pedersen, B.; Lonkeu, O.-K. *The Disruptive Nature of 3D Printing*; 2017.
- (3) Zastrow, M. 3D Printing Gets Bigger, Faster and Stronger. *Nature* **2020**, *578* (7793), 20–23. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00271-6>.
- (4) Hull, C. W. Apparatus for Production of Three-Dimensional Objects by Stereolithography. US-6027324-A, 1986.
- (5) Jakus, A. E. An Introduction to 3D Printing—Past, Present, and Future Promise. In *3D Printing in Orthopaedic Surgery*; Elsevier, 2019; pp 1–15. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-58118-9.00001-4>.
- (6) Cesarano, J. A Review of Robocasting Technology. *MRS Proc.* **1998**, *542* (May), 133. <https://doi.org/10.1557/PROC-542-133>.
- (7) Jones, R.; Haufe, P.; Sells, E.; Iravani, P.; Olliver, V.; Palmer, C.; Bowyer, A. RepRap – the Replicating Rapid Prototyper. *Robotica* **2011**, *29* (1), 177–191. <https://doi.org/10.1017/S026357471000069X>.
- (8) RepRap contributors. About <https://reprap.org/wiki/RepRap> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (9) MakerBot Industries LLC. MakerBot: 3D Printers for Educators & Professionals <https://www.makerbot.com/> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (10) Murphy, S. V.; Atala, A. 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32* (8), 773–785. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>.
- (11) Unagolla, J. M.; Jayasuriya, A. C. Hydrogel-Based 3D Bioprinting: A Comprehensive Review on Cell-Laden Hydrogels, Bioink Formulations, and Future Perspectives. *Appl. Mater. Today* **2020**, *18*, 100479. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100479>.
- (12) Moore, C. A.; Shah, N. N.; Smith, C. P.; Rameshwar, P. 3D Bioprinting and Stem Cells. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press: New York, 2018; Vol. 1842, pp 93–103. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8697-2_7.
- (13) Potjewyd, G.; Moxon, S.; Wang, T.; Domingos, M.; Hooper, N. M. Tissue Engineering 3D Neurovascular Units: A Biomaterials and Bioprinting Perspective. *Trends Biotechnol.* **2018**, *36* (4), 457–472. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.01.003>.
- (14) Mobaraki, M.; Ghaffari, M.; Yazdanpanah, A.; Luo, Y.; Mills, D. K. Bioinks and Bioprinting: A Focused Review. *Bioprinting* **2020**, *18* (January), e00080. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00080>.
- (15) Ozbolat, I. T.; Peng, W.; Ozbolat, V. Application Areas of 3D Bioprinting. *Drug Discov. Today*

- 2016**, 21 (8), 1257–1271. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.006>.
- (16) Knowlton, S.; Onal, S.; Yu, C. H.; Zhao, J. J.; Tasoglu, S. Bioprinting for Cancer Research. *Trends Biotechnol.* **2015**, 33 (9), 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.007>.
- (17) Ngo, T. D.; Kashani, A.; Imbalzano, G.; Nguyen, K. T. Q.; Hui, D. Additive Manufacturing (3D Printing): A Review of Materials, Methods, Applications and Challenges. *Compos. Part B Eng.* **2018**, 143 (December 2017), 172–196. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.02.012>.
- (18) Chua, C.; Yeong, W.; An, J. Special Issue: NextGen Materials for 3D Printing. *Materials (Basel)*. **2018**, 11 (4), 555. <https://doi.org/10.3390/ma11040555>.
- (19) Jang, J.; Park, J. Y.; Gao, G.; Cho, D.-W. Biomaterials-Based 3D Cell Printing for next-Generation Therapeutics and Diagnostics. *Biomaterials* **2018**, 156, 88–106. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.030>.
- (20) Li, Y.; Zhang, T.; Pang, Y.; Li, L.; Chen, Z.-N.; Sun, W. 3D Bioprinting of Hepatoma Cells and Application with Microfluidics for Pharmacodynamic Test of Metuzumab. *Biofabrication* **2019**, 11 (3), 034102. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab256c>.
- (21) Sirjani, E.; Migas, M.; Cragg, P. J.; Dymond, M. K. 3D Printed UV/VIS Detection Systems Constructed from Transparent Filaments and Immobilised Enzymes. *Addit. Manuf.* **2020**, 33 (February), 101094. <https://doi.org/10.1016/j.addma.2020.101094>.
- (22) Renteria, A.; Fontes, H.; Diaz, J. A.; Regis, J. E.; Chavez, L. A.; Tseng, T.-L. (Bill); Liu, Y.; Lin, Y. Optimization of 3D Printing Parameters for BaTiO₃ Piezoelectric Ceramics through Design of Experiments. *Mater. Res. Express* **2019**, 6 (8), 085706. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab200e>.
- (23) Zhu, C.; Liu, T.; Qian, F.; Chen, W.; Chandrasekaran, S.; Yao, B.; Song, Y.; Duoss, E. B.; Kuntz, J. D.; Spadaccini, C. M.; Worsley, M. A.; Li, Y. 3D Printed Functional Nanomaterials for Electrochemical Energy Storage. *Nano Today* **2017**, 15, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2017.06.007>.
- (24) Momeni, F.; Mehdi Hassani, N. S.; Liu, X.; Ni, J. A Review of 4D Printing. *Mater. Des.* **2017**, 122, 42–79. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.02.068>.
- (25) Schmelzeisen, D.; Koch, H.; Pastore, C.; Gries, T. 4D Textiles: Hybrid Textile Structures That Can Change Structural Form with Time by 3D Printing. In *Narrow and Smart Textiles*; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 189–201. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69050-6_17.
- (26) Baker, A. B.; Bates, S. R. G.; Llewellyn-Jones, T. M.; Valori, L. P. B.; Dicker, M. P. M.; Trask, R. S. 4D Printing with Robust Thermoplastic Polyurethane Hydrogel-Elastomer Trilayers. *Mater. Des.* **2019**, 163, 107544. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.107544>.

- (27) Ge, Q.; Sakhaei, A. H.; Lee, H.; Dunn, C. K.; Fang, N. X.; Dunn, M. L. Multimaterial 4D Printing with Tailorable Shape Memory Polymers. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 31110. <https://doi.org/10.1038/srep31110>.
- (28) McCue, T. Significant 3D Printing Forecast Surges To \$35.6 Billion <https://www.forbes.com/sites/tjmccue/2019/03/27/wohlers-report-2019-forecasts-35-6-billion-in-3d-printing-industry-growth-by-2024/#1c849d6a7d8a> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (29) Markets and Markets. 3D Printing Materials Market by Type (Plastic, Metal, Ceramic), End-Use Industry (Automotive, Aerospace & Defense, Healthcare, Consumer Goods, Construction), Form (Powder, Liquid, Filament), Technology, Application, and Region - Global Forecast to 2025 <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/3d-printing-materials-market-1295.html> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (30) Redwood, B.; Schöffer, F.; Garret, B. *The 3D Printing Handbook: Technologies, Design and Applications*; 3D Hubs B.V.: Amsterdam, 2017.
- (31) Asociación Española de Normalización (UNE). *UNE-EN ISO/ASTM 52900:2017 Fabricación Aditiva. Principios Generales. Terminología*; España, 2017.
- (32) Jiménez Calzado, M.; Porrás Galan, J.; Domínguez, I. A.; Romero, L.; Espinosa, M. del M. La Fabricación Aditiva. La Evidencia de Una Necesidad. *Interempresas Industria Metalmeccánica*. 2013, pp 64–82.
- (33) Asociación Española de Normalización (UNE). *UNE-EN ISO 17296-2:2017 Fabricación Aditiva. Principios Generales. Parte 2: Visión General de Categorías de Procesos y de Materias Primas*; 2017.
- (34) Bachtiar, E. O.; Erol, O.; Millrod, M.; Tao, R.; Gracias, D. H.; Romer, L. H.; Kang, S. H. 3D Printing and Characterization of a Soft and Biostable Elastomer with High Flexibility and Strength for Biomedical Applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2020**, *104* (November 2019), 103649. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103649>.
- (35) Lepowsky, E.; Tasoglu, S. 3D Printing for Drug Manufacturing: A Perspective on the Future of Pharmaceuticals. *Int. J. Bioprinting* **2017**, *4* (1), 119. <https://doi.org/10.18063/ijb.v1i1.119>.
- (36) Ying, G.; Jiang, N.; Maharjan, S.; Yin, Y.; Chai, R.; Cao, X.; Yang, J.; Miri, A. K.; Hassan, S.; Zhang, Y. S. Aqueous Two-Phase Emulsion Bioink-Enabled 3D Bioprinting of Porous Hydrogels. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (50), 1805460. <https://doi.org/10.1002/adma.201805460>.
- (37) Sánchez Restrepo, S. SLA: Impresión 3D por estereolitografía <https://www.3dnatives.com/es/impresion-3d-por-estereolitografia-les-explicamos-todo/> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (38) Chen, Q.; Zou, B.; Lai, Q.; Wang, Y.; Xue, R.; Xing, H.; Fu, X.; Huang, C.; Yao, P. A Study on Biosafety of HAP Ceramic Prepared by SLA-3D Printing Technology Directly. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2019**, *98*, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.06.031>.

-
- (39) Alifui-Segbaya, F.; Varma, S.; Lieschke, G. J.; George, R. Biocompatibility of Photopolymers in 3D Printing. *3D Print. Addit. Manuf.* **2017**, *4* (4), 185–191. <https://doi.org/10.1089/3dp.2017.0064>.
- (40) Lee, J. M.; Sing, S. L.; Zhou, M.; Yeong, W. Y. 3D Bioprinting Processes: A Perspective on Classification and Terminology. *Int. J. Bioprinting* **2018**, *4* (2). <https://doi.org/10.18063/ijb.v4i2.151>.
- (41) Sánchez Crespo, S. Guía completa: Material Jetting. <https://www.3dnatives.com/es/la-impresion-3d-polyjet23072015/> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (42) Contreras-Howard, L. Guía completa: Binder Jetting o Inyección Aglutinante. <https://www.3dnatives.com/es/inyeccion-aglutinante-te-lo-contamos-23032016/> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (43) Sánchez Restrepo, S. Guía completa: Fusión láser de lecho de polvo. <https://www.3dnatives.com/es/sinterizado-directo-de-metal-por-laser-les-explicamos-todo/> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (44) Jyothish Kumar, L.; Pandey, P. M.; Wimpenny, D. I. *3D Printing and Additive Manufacturing Technologies*; Kumar, L. J., Pandey, P. M., Wimpenny, D. I., Eds.; Springer Singapore: Singapore, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0305-0>.
- (45) Firth, J.; Basit, A. W.; Gaisford, S. The Role of Semi-Solid Extrusion Printing in Clinical Practice. In *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series*; 2018; Vol. 31, pp 133–151. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90755-0_7.
- (46) Huang, C. Y. *Extrusion-Based 3D Printing and Characterization of Edible Materials*, University of Waterloo, 2018.
- (47) Panwar, A.; Tan, L. Current Status of Bioinks for Micro-Extrusion-Based 3D Bioprinting. *Molecules* **2016**, *21* (6), 685. <https://doi.org/10.3390/molecules21060685>.
- (48) Mondal, A.; Gebeyehu, A.; Miranda, M.; Bahadur, D.; Patel, N.; Ramakrishnan, S.; Rishi, A. K.; Singh, M. Characterization and Printability of Sodium Alginate -Gelatin Hydrogel for Bioprinting NSCLC Co-Culture. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 19914. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55034-9>.
- (49) Vancauwenberghe, V.; Katalagarianakis, L.; Wang, Z.; Meerts, M.; Hertog, M.; Verboven, P.; Moldenaers, P.; Hendrickx, M. E.; Lammertyn, J.; Nicolaï, B. Pectin Based Food-Ink Formulations for 3-D Printing of Customizable Porous Food Simulants. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2017**, *42* (June), 138–150. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.011>.
- (50) Wang, L.; Zhang, M.; Bhandari, B.; Yang, C. Investigation on Fish Surimi Gel as Promising Food Material for 3D Printing. *J. Food Eng.* **2018**, *220*, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.029>.

-
- (51) Chen, Z.; Li, Z.; Li, J.; Liu, C.; Lao, C.; Fu, Y.; Liu, C.; Li, Y.; Wang, P.; He, Y. 3D Printing of Ceramics: A Review. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2019**, *39* (4), 661–687. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2018.11.013>.
- (52) Vlachakis, C.; Perry, M.; Biondi, L.; McAlorum, J. 3D Printed Temperature-Sensing Repairs for Concrete Structures. *Addit. Manuf.* **2020**, *34* (April), 101238. <https://doi.org/10.1016/j.addma.2020.101238>.
- (53) Perrot, A.; Jacquet, Y.; Rangeard, D.; Courteille, E.; Sonebi, M. Nailing of Layers: A Promising Way to Reinforce Concrete 3D Printing Structures. *Materials (Basel)*. **2020**, *13* (7), 1518. <https://doi.org/10.3390/ma13071518>.
- (54) Algahtani, M. S.; Mohammed, A. A.; Ahmad, J. Extrusion-Based 3D Printing for Pharmaceuticals: Contemporary Research and Applications. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *24* (42), 4991–5008. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190110155931>.
- (55) Herrada-Manchón, H. Dosificación Personalizada de Fármacos a Través de La Impresión 3D, Universidad de Oviedo, 2018.
- (56) Liu, Z.; Zhang, M.; Bhandari, B.; Wang, Y. 3D Printing: Printing Precision and Application in Food Sector. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *69*, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.018>.
- (57) Yang, F.; Guo, C.; Zhang, M.; Bhandari, B.; Liu, Y. Improving 3D Printing Process of Lemon Juice Gel Based on Fluid Flow Numerical Simulation. *LWT* **2019**, *102* (August 2018), 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.031>.
- (58) Sun, J.; Zhou, W.; Yan, L.; Huang, D.; Lin, L. Extrusion-Based Food Printing for Digitalized Food Design and Nutrition Control. *J. Food Eng.* **2018**, *220*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.028>.
- (59) Guo, C.-F.; Zhang, M.; Bhandari, B. A Comparative Study between Syringe-Based and Screw-Based 3D Food Printers by Computational Simulation. *Comput. Electron. Agric.* **2019**, *162* (April), 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.04.032>.
- (60) Asociación Española de Normalización (UNE). *UNE-EN ISO 17296-4:2017 Fabricación Aditiva. Principios Generales. Parte 4: Visión General Del Intercambio de Datos*; España, 2017.
- (61) Giang, K. 3D printing STL files: A step-by-step guide <https://www.3dhubs.com/knowledge-base/3d-printing-stl-files-step-step-guide/> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (62) Davies, J. 3D modeling CAD software <https://www.3dhubs.com/knowledge-base/3d-modeling-cad-software/> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (63) D., J. Top 12 Best Websites to Download Free STL Files <https://www.3dnatives.com/en/top-10-websites-stl-files-161120174/> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (64) Meers, J. Top 3D Printer CAD Software Options <https://markforged.com/blog/top-3d-printer-cad-software-options/> (accedido 31 de octubre de 2021).

-
- (65) Locker, A. 2020 Best 3D Printer Slicer Software <https://all3dp.com/1/best-3d-slicer-software-3d-printer/> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (66) He, Y.; Yang, F.; Zhao, H.; Gao, Q.; Xia, B.; Fu, J. Research on the Printability of Hydrogels in 3D Bioprinting. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 29977. <https://doi.org/10.1038/srep29977>.
- (67) Yang, F.; Zhang, M.; Bhandari, B.; Liu, Y. Investigation on Lemon Juice Gel as Food Material for 3D Printing and Optimization of Printing Parameters. *LWT* **2018**, *87*, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.054>.
- (68) Slic3r.org. Flow Math <https://manual.slic3r.org/advanced/flow-math> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (69) Gleadall, A.; Ashcroft, I.; Segal, J. VOLCO: A Predictive Model for 3D Printed Microarchitecture. *Addit. Manuf.* **2018**, *21* (April), 605–618. <https://doi.org/10.1016/j.addma.2018.04.004>.
- (70) Marchante, A. ¿Qué es un G-Code y cuál es su función en el proceso de impresión 3D? <https://www.3dnatives.com/es/g-code-proceso-impresion-3d-230920212/> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (71) Ultimaker Support. What is g-code? <https://support.ultimaker.com/hc/en-us/articles/360012733080-What-is-g-code-> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (72) RepRap contributors. G-code <https://reprap.org/wiki/G-code#G-commands> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (73) Machinekit Project. FDM/FFF GCodes <http://www.machinekit.io/docs/fdm/fdm-gcode/> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (74) Wang, J.; Shaw, L. L. Rheological and Extrusion Behavior of Dental Porcelain Slurries for Rapid Prototyping Applications. *Mater. Sci. Eng. A* **2005**, *397* (1–2), 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2005.02.045>.
- (75) Hao, L.; Mellor, S.; Seaman, O.; Henderson, J.; Sewell, N.; Sloan, M. Material Characterisation and Process Development for Chocolate Additive Layer Manufacturing. *Virtual Phys. Prototyp.* **2010**, *5* (2), 57–64. <https://doi.org/10.1080/17452751003753212>.
- (76) Dankar, I.; Haddarah, A.; Omar, F. E. L.; Sepulcre, F.; Pujolà, M. 3D Printing Technology: The New Era for Food Customization and Elaboration. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *75*, 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.018>.
- (77) Dankar, I.; Pujolà, M.; El Omar, F.; Sepulcre, F.; Haddarah, A. Impact of Mechanical and Microstructural Properties of Potato Puree-Food Additive Complexes on Extrusion-Based 3D Printing. *Food Bioprocess Technol.* **2018**, *11* (11), 2021–2031. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2159-5>.
- (78) Liu, Z.; Zhang, M.; Yang, C. Dual Extrusion 3D Printing of Mashed Potatoes/Strawberry Juice

- Gel. *LWT* **2018**, 96 (February), 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.014>.
- (79) Azam, S. M. R.; Zhang, M.; Mujumdar, A. S.; Yang, C. Study on 3D Printing of Orange Concentrate and Material Characteristics. *J. Food Process Eng.* **2018**, 41 (5), e12689. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12689>.
- (80) Hinton, T. J.; Jallerat, Q.; Palchesko, R. N.; Park, J. H.; Grodzicki, M. S.; Shue, H.-J.; Ramadan, M. H.; Hudson, A. R.; Feinberg, A. W. Three-Dimensional Printing of Complex Biological Structures by Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels. *Sci. Adv.* **2015**, 1 (9), 1–10. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500758>.
- (81) Pusch, K.; Hinton, T. J.; Feinberg, A. W. Large Volume Syringe Pump Extruder for Desktop 3D Printers. *HardwareX* **2018**, 3 (November 2017), 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2018.02.001>.
- (82) Lee, A.; Hudson, A. R.; Shiwarski, D. J.; Tashman, J. W.; Hinton, T. J.; Yerneni, S.; Bliley, J. M.; Campbell, P. G.; Feinberg, A. W. 3D Bioprinting of Collagen to Rebuild Components of the Human Heart. *Science* (80-.). **2019**, 365 (6452), 482–487. <https://doi.org/10.1126/science.aav9051>.
- (83) Khairuzzaman, A. Regulatory Perspectives on 3D Printing in Pharmaceuticals. In *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series*; 2018; Vol. 31, pp 215–236. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90755-0_11.
- (84) Vázquez, C. How to optimise post-processing in 3D printing: Experts give their advice! <https://www.3dnatives.com/en/optimise-post-processing-3d-printing-expert-advice-220820195/#!> (accedido 31 de octubre de 2021).
- (85) Datta, P.; Barui, A.; Wu, Y.; Ozbolat, V.; Moncal, K. K.; Ozbolat, I. T. Essential Steps in Bioprinting: From Pre- to Post-Bioprinting. *Biotechnol. Adv.* **2018**, 36 (5), 1481–1504. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.06.003>.
- (86) Lepowsky, E.; Muradoglu, M.; Tasoglu, S. Towards Preserving Post-Printing Cell Viability and Improving the Resolution: Past, Present, and Future of 3D Bioprinting Theory. *Bioprinting* **2018**, 11 (September), e00034. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2018.e00034>.
- (87) Pepper, M. E.; Cass, C. A. P.; Mattimore, J. P.; Burg, T.; Booth, B. W.; Burg, K. J. L.; Groff, R. E. Post-Bioprinting Processing Methods to Improve Cell Viability and Pattern Fidelity in Heterogeneous Tissue Test Systems. In *2010 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology*; IEEE, 2010; pp 259–262. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2010.5627467>.
- (88) Mezger, T. G. *The Rheology Handbook*, 4th ed.; Vincentz Network GmbH & Co., 2014.
- (89) Chhabra, R. P.; Richardson, J. F. Rheometry for Non-Newtonian Fluids. In *Non-Newtonian Flow in the Process Industries*; Chhabra, R. P., Richardson, J. F., Eds.; Butterworth-Heinemann, 1999; pp 56–109. <https://doi.org/10.1016/B978-075063770-1/50003-8>.
- (90) Chhabra, R. P.; Richardson, J. F. *Non-Newtonian Flow in the Process Industries* -

- Fundamentals and Engineering Applications.*; Butterworth-Heinemann, 1999.
- (91) Walters, K.; Hutton, J. F.; Barnes, H. A. *An Introduction to Rheology*, First edit.; Walters, K., Ed.; Elsevier Science Publishers B.V., 1993.
- (92) Ramírez-Navas, J. S. Introducción a La Reología de Alimentos. *Rev. ReCiTeIA* **2006**, No. 6, 1–46.
- (93) Masoliver i Marcos, G.; Pérez-Sánchez, M.; López-Jiménez, P. A. Modelo Experimental Para Estimar La Viscosidad de Fluidos No Newtonianos: Ajuste a Expresiones Matemáticas Convencionales. *Model. Sci. Educ. Learn.* **2017**, *10* (1), 5. <https://doi.org/10.4995/msel.2017.5901>.
- (94) Zengeni, B. T. Bingham Yield Stress and Bingham Plastic Viscosity of Homogeneous Non-Newtonian Slurries, Cape Peninsula University of Technology, 2016.
- (95) Chhabra, R. P.; Richardson, J. F. Non-Newtonian Fluid Behaviour. In *Non-Newtonian Flow and Applied Rheology: Engineering Applications*; Elsevier Ltd, 2008.
- (96) Schwab, A.; Levato, R.; D'Este, M.; Piluso, S.; Eglin, D.; Malda, J. Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. *Chem. Rev.* **2020**, *120* (19), 11028–11055. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00084>.
- (97) Lakkanna, M.; Mohan Kumar, G. C.; Kadoli, R. Computational Design of Mould Sprue for Injection Moulding Thermoplastics. *J. Comput. Des. Eng.* **2016**, *3* (1), 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.jcde.2015.06.006>.
- (98) Nindo, C. I.; Tang, J.; Powers, J. R.; Takhar, P. S. Rheological Properties of Blueberry Puree for Processing Applications. *LWT - Food Sci. Technol.* **2007**, *40* (2), 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.10.003>.
- (99) Quintáns Riveiro, L. C. Reología de Productos Alimentarios, Universidad de Santiago de Compostela, 2008.
- (100) Li, M.-C.; Wu, Q.; Song, K.; De Hoop, C. F.; Lee, S.; Qing, Y.; Wu, Y. Cellulose Nanocrystals and Polyanionic Cellulose as Additives in Bentonite Water-Based Drilling Fluids: Rheological Modeling and Filtration Mechanisms. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2016**, *55* (1), 133–143. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b03510>.
- (101) TA Instruments. Rheology Applications Note: Rheology Software Models (Flow). *TA Instruments Tech. notes - RN9*.
- (102) Sisko, A. W. The Flow of Lubricating Greases. *Ind. Eng. Chem.* **1958**, *50* (12), 1789–1792. <https://doi.org/10.1021/ie50588a042>.
- (103) Zaman, A.; Ali, N.; Bég, O. A. Numerical Study of Unsteady Blood Flow through a Vessel Using Sisko Model. *Eng. Sci. Technol. an Int. J.* **2016**, *19* (1), 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.jestch.2015.09.013>.

- (104) Balmforth, N. J.; Frigaard, I. A.; Ovarlez, G. Yielding to Stress: Recent Developments in Viscoplastic Fluid Mechanics. *Annu. Rev. Fluid Mech.* **2014**, *46* (1), 121–146. <https://doi.org/10.1146/annurev-fluid-010313-141424>.
- (105) El-Borhamy, M. Numerical Study of the Stationary Generalized Viscoplastic Fluid Flows. *Alexandria Eng. J.* **2018**, *57* (3), 2007–2018. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2017.04.018>.
- (106) Bird, R. B.; Dai, G. C.; Yarusso, B. J. The Rheology and Flow of Viscoplastic Materials. *Rev. Chem. Eng.* **1983**, *1* (1), 1–70. <https://doi.org/10.1515/revce-1983-0102>.
- (107) Adewale, F. J.; Lucky, A. P.; Oluwabunmi, A. P.; Boluwaji, E. F. Selecting the Most Appropriate Model for Rheological Characterization of Synthetic Based Drilling Mud. *Int. J. Appl. Eng. Res.* **2017**, *12* (18), 7614–7629.
- (108) Fernández, C.; Alvarez, M. D.; Canet, W. Rheological Behaviour of Fresh and Frozen Potato Puree in Steady and Dynamic Shear at Different Temperatures. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *218* (6), 544–553. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0897-2>.
- (109) Fernández, C.; Canet, W.; Alvarez, M. D. Quality of Mashed Potatoes: Effect of Adding Blends of Kappa-Carrageenan and Xanthan Gum. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *229* (2), 205–222. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1044-x>.
- (110) Sokmen, A.; Gunes, G. Influence of Some Bulk Sweeteners on Rheological Properties of Chocolate. *LWT - Food Sci. Technol.* **2006**, *39* (10), 1053–1058. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.03.002>.
- (111) Talens Oliag, P. Caracterización Del Comportamiento Reológico de Un Alimento Fluido Plástico., Universitat Politècnica de València (UPV), 2016.
- (112) HadjSadok, A.; Moulai-Mostefa, N.; Rebiha, M. Rheological Properties and Phase Separation of Xanthan-Sodium Caseinate Mixtures Analyzed by a Response Surface Method. *Int. J. Food Prop.* **2010**, *13* (2), 369–380. <https://doi.org/10.1080/10942910802532531>.
- (113) Sochi, T. Non-Newtonian Flow in Porous Media. *Polymer (Guildf)*. **2010**, *51* (22), 5007–5023. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.07.047>.
- (114) Mewis, J.; Wagner, N. J. *Colloidal Suspension Rheology*; Cambridge University Press: Cambridge, 2011; Vol. 9780521515. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511977978>.
- (115) Armelin, E.; Martí, M.; Rudé, E.; Labanda, J.; Llorens, J.; Alemán, C. A Simple Model to Describe the Thixotropic Behavior of Paints. *Prog. Org. Coatings* **2006**, *57* (3), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2006.09.002>.
- (116) TA Instruments. Understanding Rheology of Structured Fluids. *TA Instruments Tech. notes - AAN016*.
- (117) Sha, J.; Zhang, F.; Zhang, H. Thixotropic Flow Behaviour in Chemical Pulp Fibre Suspensions. *BioResources* **2016**, *11* (2), 3481–3493. <https://doi.org/10.15376/biores.11.2.3481-3493>.
- (118) Malvern Instruments. *A Basic Introduction to Rheology*; 2016.

- (119) Hyun, K.; Wilhelm, M.; Klein, C. O.; Cho, K. S.; Nam, J. G.; Ahn, K. H.; Lee, S. J.; Ewoldt, R. H.; McKinley, G. H. A Review of Nonlinear Oscillatory Shear Tests: Analysis and Application of Large Amplitude Oscillatory Shear (LAOS). *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36* (12), 1697–1753. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.002>.
- (120) Tschoegl, N. W. *The Phenomenological Theory of Linear Viscoelastic Behavior*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1989. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-73602-5>.
- (121) Trujillo, L. A.; Santos, J.; Calero, N.; Alfaro, M. C.; Muñoz, J. Caracterización Reológica de Una Suspoemulsión Comercial Para Uso Agroquímico. *Afinidad LXX* **2013**, *561* (Enero-Marzo), 54–59.
- (122) Duty, C.; Ajinjeru, C.; Kishore, V.; Compton, B.; Hmeidat, N.; Chen, X.; Liu, P.; Hassen, A. A.; Lindahl, J.; Kunc, V. What Makes a Material Printable? A Viscoelastic Model for Extrusion-Based 3D Printing of Polymers. *J. Manuf. Process.* **2018**, *35* (May), 526–537. <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2018.08.008>.
- (123) Kyle, S.; Jessop, Z. M.; Al-Sabah, A.; Whitaker, I. S. 'Printability' of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art.' *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6* (16), 1700264. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700264>.
- (124) Díaz, I.; Gallegos, C.; Brito-de la Fuente, E.; Martínez, I.; Valencia, C.; Sánchez, M. C.; Diaz, M. J.; Franco, J. M. 3D Printing in Situ Gelification of κ -Carrageenan Solutions: Effect of Printing Variables on the Rheological Response. *Food Hydrocoll.* **2019**, *87*, 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.010>.
- (125) Liu, Z.; Bhandari, B.; Prakash, S.; Mantihal, S.; Zhang, M. Linking Rheology and Printability of a Multicomponent Gel System of Carrageenan-Xanthan-Starch in Extrusion Based Additive Manufacturing. *Food Hydrocoll.* **2019**, *87*, 413–424. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.026>.
- (126) Blaeser, A.; Duarte Campos, D. F.; Puster, U.; Richtering, W.; Stevens, M. M.; Fischer, H. Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting Is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5* (3), 326–333. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500677>.
- (127) Smith, P. T.; Basu, A.; Saha, A.; Nelson, A. Chemical Modification and Printability of Shear-Thinning Hydrogel Inks for Direct-Write 3D Printing. *Polymer (Guildf)*. **2018**, *152*, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.01.070>.
- (128) Liu, Z.; Bhandari, B.; Prakash, S.; Zhang, M. Creation of Internal Structure of Mashed Potato Construct by 3D Printing and Its Textural Properties. *Food Res. Int.* **2018**, *111* (2017), 534–543. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.075>.
- (129) Paxton, N.; Smolan, W.; Böck, T.; Melchels, F.; Groll, J.; Jungst, T. Proposal to Assess

- Printability of Bioinks for Extrusion-Based Bioprinting and Evaluation of Rheological Properties Governing Bioprintability. *Biofabrication* **2017**, *9* (4), 044107. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa8dd8>.
- (130) Sun, A.; Gunasekaran, S. Yield Stress in Foods: Measurements and Applications. *Int. J. Food Prop.* **2009**, *12* (1), 70–101. <https://doi.org/10.1080/10942910802308502>.
- (131) Saha, D.; Bhattacharya, S. Hydrocolloids as Thickening and Gelling Agents in Food: A Critical Review. *J. Food Sci. Technol.* **2010**, *47* (6), 587–597. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0162-6>.
- (132) Kreimendahl, F.; Köpf, M.; Thiebes, A. L.; Duarte Campos, D. F.; Blaeser, A.; Schmitz-Rode, T.; Apel, C.; Jockenhoevel, S.; Fischer, H. Three-Dimensional Printing and Angiogenesis: Tailored Agarose-Type I Collagen Blends Comprise Three-Dimensional Printability and Angiogenesis Potential for Tissue-Engineered Substitutes. *Tissue Eng. Part C Methods* **2017**, *23* (10), 604–615. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2017.0234>.
- (133) Anton Paar GmbH. Amplitude sweeps <https://wiki.anton-paar.com/en/amplitude-sweeps/> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (134) Talens Oliag, P. Cómo Caracterizar El Comportamiento Viscoelástico de Un Alimento, Universitat Politècnica de València (UPV), 2018.
- (135) TA Instruments. Rheological Techniques for Yield Stress Analysis. *TA Instruments Tech. notes - RH025* 1–6.
- (136) Cyriac, F.; Lugt, P. M.; Bosman, R. On a New Method to Determine the Yield Stress in Lubricating Grease. *Tribol. Trans.* **2015**, *58* (6), 1021–1030. <https://doi.org/10.1080/10402004.2015.1035414>.
- (137) Cox, T. R.; Erler, J. T. Remodeling and Homeostasis of the Extracellular Matrix: Implications for Fibrotic Diseases and Cancer. *Dis. Model. Mech.* **2011**, *4* (2), 165–178. <https://doi.org/10.1242/dmm.004077>.
- (138) Bachmann, B.; Spitz, S.; Schädl, B.; Teuschl, A. H.; Redl, H.; Nürnberger, S.; Ertl, P. Stiffness Matters: Fine-Tuned Hydrogel Elasticity Alters Chondrogenic Redifferentiation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8* (April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00373>.
- (139) Ren, Y.; Zhang, H.; Wang, Y.; Du, B.; Yang, J.; Liu, L.; Zhang, Q. Hyaluronic Acid Hydrogel with Adjustable Stiffness for Mesenchymal Stem Cell 3D Culture via Related Molecular Mechanisms to Maintain Stemness and Induce Cartilage Differentiation. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4* (3), 2601–2613. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01591>.
- (140) Cox, T.; Madsen, C. Relative Stiffness Measurements of Cell-Embedded Hydrogels by Shear Rheology in Vitro. *BIO-PROTOCOL* **2017**, *7* (1), 1–8. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2101>.
- (141) GLOBOCAN. The Global Cancer Observatory - All Cancers. *Int. Agent Res. Cancer - WHO* **2020**, *419*, 199–200.

- (142) World Health Organization (WHO). Cáncer. Datos y cifras <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (143) Asociación Española contra el Cáncer (AECC). *El Impacto Económico y Social Del Cáncer En España*; 2020.
- (144) Asociación Española contra el Cáncer (AECC). Tipos de Cáncer <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (145) Sitarski, A. M.; Fairfield, H.; Falank, C.; Reagan, M. R. 3D Tissue Engineered in Vitro Models of Cancer in Bone. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4* (2), 324–336. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.7b00097>.
- (146) Pampaloni, F.; Reynaud, E. G.; Stelzer, E. H. K. The Third Dimension Bridges the Gap between Cell Culture and Live Tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8* (10), 839–845. <https://doi.org/10.1038/nrm2236>.
- (147) Mao, S.; Pang, Y.; Liu, T.; Shao, Y.; He, J.; Yang, H.; Mao, Y.; Sun, W. Bioprinting of in Vitro Tumor Models for Personalized Cancer Treatment: A Review. *Biofabrication* **2020**, *12* (4), 042001. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab97c0>.
- (148) Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12* (1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- (149) Edmondson, R.; Broglie, J. J.; Adcock, A. F.; Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* **2014**, *12* (4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>.
- (150) Doctor, A.; Seifert, V.; Ullrich, M.; Hauser, S.; Pietzsch, J. Three-Dimensional Cell Culture Systems in Radiopharmaceutical Cancer Research. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12* (10), 2765. <https://doi.org/10.3390/cancers12102765>.
- (151) Ozbolat, I. T.; Moncal, K. K.; Gudapati, H. Evaluation of Bioprinter Technologies. *Addit. Manuf.* **2017**, *13*, 179–200. <https://doi.org/10.1016/j.addma.2016.10.003>.
- (152) Lee, C.; Abelseh, E.; de la Vega, L.; Willerth, S. M. Bioprinting a Novel Glioblastoma Tumor Model Using a Fibrin-Based Bioink for Drug Screening. *Mater. Today Chem.* **2019**, *12*, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.12.005>.
- (153) Chaicharoenaudomrung, N.; Kunhorm, P.; Noisa, P. Three-Dimensional Cell Culture Systems as an in Vitro Platform for Cancer and Stem Cell Modeling. *World J. Stem Cells* **2019**, *11* (12), 1065–1083. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i12.1065>.
- (154) Sánchez-Salazar, M. G.; Álvarez, M. M.; Trujillo-de Santiago, G. Advances in 3D Bioprinting for the Biofabrication of Tumor Models. *Bioprinting* **2021**, *21*, e00120. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00120>.
- (155) Forget, A.; Dagarville, T. The next pharmaceutical revolution could be 3D bioprinted

- <https://theconversation.com/the-next-pharmaceutical-revolution-could-be-3d-bioprinted-79676> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (156) Li, H.; Liu, S.; Lin, L. Rheological Study on 3D Printability of Alginate Hydrogel and Effect of Graphene Oxide. *Int. J. Bioprinting* **2016**, *2* (2), 10–12. <https://doi.org/10.18063/IJB.2016.02.007>.
- (157) He, Y.; Nie, J.; Xie, M.; Gao, Q. Why Choose 3D Bioprinting? Part III: Printing in Vitro 3D Models for Drug Screening. *Bio-Design Manuf.* **2020**, *3* (3), 160–163. <https://doi.org/10.1007/s42242-020-00067-7>.
- (158) Elsevier Connect. Colágenos: tipos, composición, características y distribución en tejidos <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/colagenos-tipos-composicion-distribucion-tejidos> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (159) Lizarbe, M. A. El Colágeno, ¿un Cemento Biológico Que Mantiene La Arquitectura y Plasticidad Tisular? *Real Acad. Ciencias* **2001**, 119–138.
- (160) Lee, J.; Kim, G. Three-Dimensional Hierarchical Nanofibrous Collagen Scaffold Fabricated Using Fibrillated Collagen and Pluronic F-127 for Regenerating Bone Tissue. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (42), 35801–35811. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14088>.
- (161) Rajan, N.; Habermehl, J.; Coté, M.-F.; Doillon, C. J.; Mantovani, D. Preparation of Ready-to-Use, Storable and Reconstituted Type I Collagen from Rat Tail Tendon for Tissue Engineering Applications. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (6), 2753–2758. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.430>.
- (162) Doyle, A. D. Generation of 3D Collagen Gels with Controlled Diverse Architectures. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2016**, *72* (1), 1–22. <https://doi.org/10.1002/cpcb.9>.
- (163) Yang, X.; Lu, Z.; Wu, H.; Li, W.; Zheng, L.; Zhao, J. Collagen-Alginate as Bioink for Three-Dimensional (3D) Cell Printing Based Cartilage Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *83* (September), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.09.002>.
- (164) Ng, W. L.; Yeong, W. Y.; Naing, M. W. Polyelectrolyte Gelatin-Chitosan Hydrogel Optimized for 3D Bioprinting in Skin Tissue Engineering. *Int. J. Bioprinting* **2016**, *2* (1), 53–62. <https://doi.org/10.18063/IJB.2016.01.009>.
- (165) Heidenreich, A. C.; Pérez-Recalde, M.; González Wusener, A.; Hermida, É. B. Collagen and Chitosan Blends for 3D Bioprinting: A Rheological and Printability Approach. *Polym. Test.* **2020**, *82* (October 2019), 106297. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.106297>.
- (166) Grover, C. N.; Cameron, R. E.; Best, S. M. Investigating the Morphological, Mechanical and Degradation Properties of Scaffolds Comprising Collagen, Gelatin and Elastin for Use in Soft Tissue Engineering. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2012**, *10*, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.02.028>.
- (167) Wang, C.-S.; Natale, G.; Virgilio, N.; Heuzey, M.-C. Synergistic Gelation of Gelatin B with Xanthan Gum. *Food Hydrocoll.* **2016**, *60*, 374–383.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.043>.
- (168) Hanani, Z. A. N. Gelatin. In *Encyclopedia of Food and Health*; Elsevier, 2016; pp 191–195. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00347-0>.
- (169) Usta, M.; Piech, D. .; MacCrone, R. .; Hillig, W. . Behavior and Properties of Neat and Filled Gelatins. *Biomaterials* **2003**, *24* (1), 165–172. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00274-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00274-0).
- (170) Chou, S.-F.; Luo, L.-J.; Lai, J.-Y.; Ma, D. H.-K. On the Importance of Bloom Number of Gelatin to the Development of Biodegradable in Situ Gelling Copolymers for Intracameral Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2016**, *511* (1), 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.129>.
- (171) Gelatine Manufacturers of Europe (GME). Gelatina: Fabricación <https://www.gelatine.org/es/gelatina/fabricacion.html> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (172) Lureña, M. Á. ¿Es cierto que la gelatina se hace a partir de piel y huesos de animales? <http://www.gominolasdepetroleo.com/2011/10/es-cierto-que-la-gelatina-se-hace.html> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (173) Jiang, T.; Munguia-Lopez, J. G.; Flores-Torres, S.; Grant, J.; Vijayakumar, S.; Leon-Rodriguez, A. De; Kinsella, J. M. Directing the Self-Assembly of Tumour Spheroids by Bioprinting Cellular Heterogeneous Models within Alginate/Gelatin Hydrogels. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 4575. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04691-9>.
- (174) Talebian, S.; Mehrali, M.; Taebnia, N.; Pennisi, C. P.; Kadumudi, F. B.; Foroughi, J.; Hasany, M.; Nikkhah, M.; Akbari, M.; Orive, G.; Dolatshahi-Pirouz, A. Self-Healing Hydrogels: The Next Paradigm Shift in Tissue Engineering? *Adv. Sci.* **2019**, *6* (16), 1801664. <https://doi.org/10.1002/advs.201801664>.
- (175) Klotz, B. J.; Gawlitta, D.; Rosenberg, A. J. W. P.; Malda, J.; Melchels, F. P. W. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends Biotechnol.* **2016**, *34* (5), 394–407. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.01.002>.
- (176) Bonmatí Limorte, M.; León Albert, G. Estudio Del Proceso de Transformación Del Colágeno En Gelatina. *An. la Univ. Murcia. Ciencias* **1983**.
- (177) Zhao, Y.; Li, Y.; Mao, S.; Sun, W.; Yao, R. The Influence of Printing Parameters on Cell Survival Rate and Printability in Microextrusion-Based 3D Cell Printing Technology. *Biofabrication* **2015**, *7* (4), 045002. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/4/045002>.
- (178) Kankala, R.; Lu, F.-J.; Liu, C.-G.; Zhang, S.-S.; Chen, A.-Z.; Wang, S.-B. Effect of Icaritin on Engineered 3D-Printed Porous Scaffolds for Cartilage Repair. *Materials (Basel)*. **2018**, *11* (8), 1390. <https://doi.org/10.3390/ma11081390>.
- (179) Sarker, B.; Singh, R.; Silva, R.; Roether, J. A.; Kaschta, J.; Detsch, R.; Schubert, D. W.; Cicha, I.; Boccaccini, A. R. Evaluation of Fibroblasts Adhesion and Proliferation on Alginate-

- Gelatin Crosslinked Hydrogel. *PLoS One* **2014**, 9 (9), e107952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107952>.
- (180) Ding, H.; Illsley, N. P.; Chang, R. C. 3D Bioprinted GelMA Based Models for the Study of Trophoblast Cell Invasion. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 18854. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55052-7>.
- (181) You, F.; Wu, X.; Chen, X. 3D Printing of Porous Alginate/Gelatin Hydrogel Scaffolds and Their Mechanical Property Characterization. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2017**, 66 (6), 299–306. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1201830>.
- (182) Campiglio, C. E.; Contessi Negrini, N.; Farè, S.; Draghi, L. Cross-Linking Strategies for Electrospun Gelatin Scaffolds. *Materials (Basel)*. **2019**, 12 (15), 2476. <https://doi.org/10.3390/ma12152476>.
- (183) Ore B., Y.; Pichilingue L, E. R.; Valderrama Negrón, A. C. Extracción y Caracterización Del Alginato de Sodio de La Macroalga *Macrocystis Pyrifera*. *Rev. la Soc. Química del Perú* **2020**, 86 (3), 276–287. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v86i3.300>.
- (184) Sarker, B.; Papageorgiou, D. G.; Silva, R.; Zehnder, T.; Gul-E-Noor, F.; Bertmer, M.; Kaschta, J.; Chrissafis, K.; Detsch, R.; Boccaccini, A. R. Fabrication of Alginate–Gelatin Crosslinked Hydrogel Microcapsules and Evaluation of the Microstructure and Physico-Chemical Properties. *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2 (11), 1470. <https://doi.org/10.1039/c3tb21509a>.
- (185) Wan, L. Q.; Jiang, J.; Arnold, D. E.; Guo, X. E.; Lu, H. H.; Mow, V. C. Calcium Concentration Effects on the Mechanical and Biochemical Properties of Chondrocyte–Alginate Constructs. *Cell. Mol. Bioeng.* **2008**, 1 (1), 93–102. <https://doi.org/10.1007/s12195-008-0014-x>.
- (186) American Type Culture Collection (ATCC). ATCC Animal Cell Culture Guide. American Type Culture Collection (ATCC): Virginia 2020, pp 1–32.
- (187) Ozturk, S. S.; Palsson, B. O. Effect of Medium Osmolarity on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody Production. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, 37 (10), 989–993. <https://doi.org/10.1002/bit.260371015>.
- (188) Merck KGaA. MEM (Minimum Essential Medium Eagle) <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/mem-media> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (189) Babich, H.; Liebling, E. J.; Burger, R. F.; Zuckerbraun, H. L.; Schuck, A. G. Choice of DMEM, Formulated with or without Pyruvate, Plays an Important Role in Assessing the in Vitro Cytotoxicity of Oxidants and Prooxidant Nutraceuticals. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **2009**, 45 (5–6), 226–233. <https://doi.org/10.1007/s11626-008-9168-z>.
- (190) Thorat, A. A.; Suryanarayanan, R. Characterization of Phosphate Buffered Saline (PBS) in Frozen State and after Freeze-Drying. *Pharm. Res.* **2019**, 36 (7), 98. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2619-2>.

- (191) Emadzadeh, B.; Razavi, S. M. A.; Rezvani, E.; Schleining, G. Steady Shear Rheological Behavior and Thixotropy of Low-Calorie Pistachio Butter. *Int. J. Food Prop.* **2015**, *18* (1), 137–148. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.822882>.
- (192) Ibidi GmbH. μ -Dish 35 mm, low <https://ibidi.com/dishes/14--dish-35-mm-low-ibitreat.html> (accedido 13 de diciembre de 2021).
- (193) Yoo, T.-K.; Min, J. W.; Kim, M. K.; Lee, E.; Kim, J.; Lee, H.-B.; Kang, Y. J.; Kim, Y.-G.; Moon, H.-G.; Moon, W. K.; Cho, N.; Noh, D.-Y.; Han, W. In Vivo Tumor Growth Rate Measured by US in Preoperative Period and Long Term Disease Outcome in Breast Cancer Patients. *PLoS One* **2015**, *10* (12), e0144144. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144144>.
- (194) Pinto, G.; Brou, C.; Zurzolo, C. Tunneling Nanotubes: The Fuel of Tumor Progression? *Trends in Cancer* **2020**, *6* (10), 874–888. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.04.012>.
- (195) Celada, L. Tesis Doctoral En Curso, Universidad de Oviedo.
- (196) Herrada-Manchón, H.; Celada, L.; Rodríguez-González, D.; Alejandro Fernández, M.; Aguilar, E.; Chiara, M.-D. Three-Dimensional Bioprinted Cancer Models: A Powerful Platform for Investigating Tunneling Nanotube-like Cell Structures in Complex Microenvironments. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *128*, 112357. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112357>.
- (197) Borgström, F.; Karlsson, L.; Ortsäter, G.; Norton, N.; Halbout, P.; Cooper, C.; Lorentzon, M.; McCloskey, E. V.; Harvey, N. C.; Javaid, M. K.; Kanis, J. A. Fragility Fractures in Europe: Burden, Management and Opportunities. *Arch. Osteoporos.* **2020**, *15* (1), 59. <https://doi.org/10.1007/s11657-020-0706-y>.
- (198) International Osteoporosis Foundation. *Broken Bones, Broken Lives: A Roadmap to Solve the Fragility Fracture Crisis in Europe*; 2020.
- (199) cmRNAbone Project. Why cmRNAbone? <https://www.cmrnabone.eu/about/why-cmrnabone> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (200) Daly, A. C.; Pitacco, P.; Nulty, J.; Cunniffe, G. M.; Kelly, D. J. 3D Printed Microchannel Networks to Direct Vascularisation during Endochondral Bone Repair. *Biomaterials* **2018**, *162*, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.057>.
- (201) Sun, H.; Hu, C.; Zhou, C.; Wu, L.; Sun, J.; Zhou, X.; Xing, F.; Long, C.; Kong, Q.; Liang, J.; Fan, Y.; Zhang, X. 3D Printing of Calcium Phosphate Scaffolds with Controlled Release of Antibacterial Functions for Jaw Bone Repair. *Mater. Des.* **2020**, *189*, 108540. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.108540>.
- (202) Wu, Y.; Woodbine, L.; Carr, A. M.; Pillai, A. R.; Nokhodchi, A.; Maniruzzaman, M. 3D Printed Calcium Phosphate Cement (CPC) Scaffolds for Anti-Cancer Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (11), 1077. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111077>.
- (203) van Dijk, L.; de Groot, F.; Yuan, H.; Campion, C.; Patel, A.; Poelstra, K.; de Bruijn, J. From

- Benchtop to Clinic: A Translational Analysis of the Immune Response to Submicron Topography and Its Relevance to Bone Healing. *Eur. Cells Mater.* **2021**, *41*, 756–773. <https://doi.org/10.22203/eCM.v041a48>.
- (204) Li, N.; Guo, R.; Zhang, Z. J. Bioink Formulations for Bone Tissue Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9* (February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630488>.
- (205) Ratheesh, G.; Vaquette, C.; Xiao, Y. Patient-Specific Bone Particles Bioprinting for Bone Tissue Engineering. *Adv. Healthc. Mater.* **2020**, *9* (23), 2001323. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001323>.
- (206) Chimene, D.; Miller, L.; Cross, L. M.; Jaiswal, M. K.; Singh, I.; Gaharwar, A. K. Nanoengineered Osteoinductive Bioink for 3D Bioprinting Bone Tissue. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (14), 15976–15988. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b19037>.
- (207) Ahlfeld, T.; Cubo-Mateo, N.; Cometta, S.; Guduric, V.; Vater, C.; Bernhardt, A.; Akkineni, A. R.; Lode, A.; Gelinsky, M. A Novel Plasma-Based Bioink Stimulates Cell Proliferation and Differentiation in Bioprinted, Mineralized Constructs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (11), 12557–12572. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c00710>.
- (208) Akkineni, A. R.; Luo, Y.; Schumacher, M.; Nies, B.; Lode, A.; Gelinsky, M. 3D Plotting of Growth Factor Loaded Calcium Phosphate Cement Scaffolds. *Acta Biomater.* **2015**, *27*, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.036>.
- (209) Shao, H.; He, J.; Lin, T.; Zhang, Z.; Zhang, Y.; Liu, S. 3D Gel-Printing of Hydroxyapatite Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Ceram. Int.* **2019**, *45* (1), 1163–1170. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.09.300>.
- (210) Lin, K.-F.; He, S.; Song, Y.; Wang, C.-M.; Gao, Y.; Li, J.-Q.; Tang, P.; Wang, Z.; Bi, L.; Pei, G.-X. Low-Temperature Additive Manufacturing of Biomimic Three-Dimensional Hydroxyapatite/Collagen Scaffolds for Bone Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (11), 6905–6916. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b00815>.
- (211) Yue, S.; He, H.; Li, B.; Hou, T. Hydrogel as a Biomaterial for Bone Tissue Engineering: A Review. *Nanomaterials* **2020**, *10* (8), 1511. <https://doi.org/10.3390/nano10081511>.
- (212) Zhang, J.; Barbieri, D.; ten Hoopen, H.; de Bruijn, J. D.; van Blitterswijk, C. A.; Yuan, H. Microporous Calcium Phosphate Ceramics Driving Osteogenesis through Surface Architecture. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2015**, *103* (3), 1188–1199. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35272>.
- (213) Duan, R.; van Dijk, L.; Barbieri, D.; de Groot, F.; Yuan, H.; de Bruijn, J. Accelerated Bone Formation by Biphasic Calcium Phosphate with a Novel Sub-Micron Surface Topography. *Eur. Cells Mater.* **2019**, *37* (April), 60–73. <https://doi.org/10.22203/eCM.v037a05>.
- (214) Perić Kačarević, Ž.; Rider, P.; Alkildani, S.; Retnasingh, S.; Pejakić, M.; Schnettler, R.; Gosau, M.; Smeets, R.; Jung, O.; Barbeck, M. An Introduction to Bone Tissue Engineering. *Int. J. Artif. Organs* **2020**, *43* (2), 69–86. <https://doi.org/10.1177/0391398819876286>.

- (215) Tebyanian, H.; Norahan, M. H.; Eyni, H.; Movahedin, M.; Mortazavi, S. J.; Karami, A.; Nourani, M. R.; Baheiraei, N. Effects of Collagen/ β -Tricalcium Phosphate Bone Graft to Regenerate Bone in Critically Sized Rabbit Calvarial Defects. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2019**, *17* (1). <https://doi.org/10.1177/2280800018820490>.
- (216) Leucht, A.; Volz, A.-C.; Rogal, J.; Borchers, K.; Kluger, P. J. Advanced Gelatin-Based Vascularization Bioinks for Extrusion-Based Bioprinting of Vascularized Bone Equivalents. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 5330. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62166-w>.
- (217) Baeza, R. I. Interacciones Entre β -Lactoglobulina y Polisacáridos En Coloides Alimentarios., Universidad de Buenos Aires, 2003.
- (218) World of Molecules. Chemical and Physical Properties of Xanthan Gum in Cooking https://www.scienceofcooking.com/chemical_physical_properties_xanthan_gum.htm (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (219) Nasrollahzadeh, M.; Sajjadi, M.; Nezafat, Z.; Shafiei, N. Polysaccharide Biopolymer Chemistry. *Biopolym. Met. Nanoparticle Chem. Sustain. Appl.* **2021**, 45–105. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822108-2.00019-3>.
- (220) Petri, D. F. S. Xanthan Gum: A Versatile Biopolymer for Biomedical and Technological Applications. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132* (23), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.42035>.
- (221) Kumar, A.; Rao, K. M.; Han, S. S. Application of Xanthan Gum as Polysaccharide in Tissue Engineering: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *180* (August 2017), 128–144. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.009>.
- (222) Bombaldi de Souza, R. F.; Bombaldi de Souza, F. C.; Thorpe, A.; Mantovani, D.; Papat, K. C.; Moraes, Â. M. Phosphorylation of Chitosan to Improve Osteoinduction of Chitosan/Xanthan-Based Scaffolds for Periosteal Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *143*, 619–632. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.004>.
- (223) Izawa, H.; Nishino, S.; Maeda, H.; Morita, K.; Ifuku, S.; Morimoto, M.; Saimoto, H.; Kadokawa, J. Mineralization of Hydroxyapatite upon a Unique Xanthan Gum Hydrogel by an Alternate Soaking Process. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *102* (1), 846–851. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.080>.
- (224) Dyondi, D.; Webster, T. J.; Banerjee, R. A Nanoparticulate Injectable Hydrogel as a Tissue Engineering Scaffold for Multiple Growth Factor Delivery for Bone Regeneration. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 47–59. <https://doi.org/10.2147/IJN.S37953>.
- (225) Han, D.; Kim, J. H.; Lee, J. H.; Kang, S.-T. Critical Grain Size of Fine Aggregates in the View of the Rheology of Mortar. *Int. J. Concr. Struct. Mater.* **2017**, *11* (4), 627–635. <https://doi.org/10.1007/s40069-017-0217-4>.
- (226) Arizzi, A.; Hendrickx, R.; Cultrone, G.; Van Balen, K. Diferencias En Las Propiedades

- Reológicas de Suspensiones de Cal Calcítica y Dolomítica: Influencia de Las Características de Las Partículas e Implicaciones Prácticas En La Fabricación de Morteros de Cal. *Mater. Construcción* **2012**, 62 (306), 231–250. <https://doi.org/10.3989/mc.2011.00311>.
- (227) Zhang, T.; Lin, S.; Shao, X.; Zhang, Q.; Xue, C.; Zhang, S.; Lin, Y.; Zhu, B.; Cai, X. Effect of Matrix Stiffness on Osteoblast Functionalization. *Cell Prolif.* **2017**, 50 (3), e12338. <https://doi.org/10.1111/cpr.12338>.
- (228) Yao, D.; Qiao, F.; Song, C.; Lv, Y. Matrix Stiffness Regulates Bone Repair by Modulating 12-Lipoxygenase-Mediated Early Inflammation. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, 128 (August), 112359. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112359>.
- (229) Zhang, J.; Wehrle, E.; Adamek, P.; Paul, G. R.; Qin, X.-H.; Rubert, M.; Müller, R. Optimization of Mechanical Stiffness and Cell Density of 3D Bioprinted Cell-Laden Scaffolds Improves Extracellular Matrix Mineralization and Cellular Organization for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2020**, 114, 307–322. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.016>.
- (230) Maisani, M.; Pezzoli, D.; Chassande, O.; Mantovani, D. Cellularizing Hydrogel-Based Scaffolds to Repair Bone Tissue: How to Create a Physiologically Relevant Micro-Environment? *J. Tissue Eng.* **2017**, 8. <https://doi.org/10.1177/2041731417712073>.
- (231) Holback, H.; Yeo, Y.; Park, K. Hydrogel Swelling Behavior and Its Biomedical Applications. In *Biomedical Hydrogels*; Elsevier, 2011; pp 3–24. <https://doi.org/10.1533/9780857091383.1.3>.
- (232) Naghieh, S.; Sarker, M. D.; Abelseth, E.; Chen, X. Indirect 3D Bioprinting and Characterization of Alginate Scaffolds for Potential Nerve Tissue Engineering Applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2019**, 93 (February), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.02.014>.
- (233) Schork, N. J. Personalized Medicine: Time for One-Person Trials. *Nature* **2015**, 520 (7549), 609–611. <https://doi.org/10.1038/520609a>.
- (234) Whirl-Carrillo, M.; McDonagh, E. M.; Hebert, J. M.; Gong, L.; Sangkuhl, K.; Thorn, C. F.; Altman, R. B.; Klein, T. E. Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2012**, 92 (4), 414–417. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.96>.
- (235) Mukherjee, D.; Topol, E. J. Pharmacogenomics in Cardiovascular Diseases. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2002**, 44 (6), 479–498. <https://doi.org/10.1053/pcad.2002.123467>.
- (236) Awad, A.; Trenfield, S. J.; Gaisford, S.; Basit, A. W. 3D Printed Medicines: A New Branch of Digital Healthcare. *Int. J. Pharm.* **2018**, 548 (1), 586–596. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.024>.
- (237) Norman, J.; Madurawe, R. D.; Moore, C. M. V.; Khan, M. A.; Khairuzzaman, A. A New Chapter in Pharmaceutical Manufacturing: 3D-Printed Drug Products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, 108, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.001>.
- (238) Trenfield, S. J.; Awad, A.; Goyanes, A.; Gaisford, S.; Basit, A. W. 3D Printing

- Pharmaceuticals: Drug Development to Frontline Care. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39* (5), 440–451. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.02.006>.
- (239) Goyanes, A.; Kobayashi, M.; Martínez-Pacheco, R.; Gaisford, S.; Basit, A. W. Fused-Filament 3D Printing of Drug Products: Microstructure Analysis and Drug Release Characteristics of PVA-Based Caplets. *Int. J. Pharm.* **2016**, *514* (1), 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.021>.
- (240) Goyanes, A.; Wang, J.; Buanz, A.; Martínez-Pacheco, R.; Telford, R.; Gaisford, S.; Basit, A. W. 3D Printing of Medicines: Engineering Novel Oral Devices with Unique Design and Drug Release Characteristics. *Mol. Pharm.* **2015**, *12* (11), 4077–4084. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00510>.
- (241) Okwuosa, T. C.; Pereira, B. C.; Arafat, B.; Cieszynska, M.; Isreb, A.; Alhnan, M. A. Fabricating a Shell-Core Delayed Release Tablet Using Dual FDM 3D Printing for Patient-Centred Therapy. *Pharm. Res.* **2017**, *34* (2), 427–437. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2073-3>.
- (242) Sadia, M.; Arafat, B.; Ahmed, W.; Forbes, R. T.; Alhnan, M. A. Channelled Tablets: An Innovative Approach to Accelerating Drug Release from 3D Printed Tablets. *J. Control. Release* **2018**, *269* (November 2017), 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.022>.
- (243) Khaled, S. A.; Burley, J. C.; Alexander, M. R.; Yang, J.; Roberts, C. J. 3D Printing of Tablets Containing Multiple Drugs with Defined Release Profiles. *Int. J. Pharm.* **2015**, *494* (2), 643–650. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.067>.
- (244) Khaled, S. A.; Burley, J. C.; Alexander, M. R.; Yang, J.; Roberts, C. J. 3D Printing of Five-in-One Dose Combination Polypill with Defined Immediate and Sustained Release Profiles. *J. Control. Release* **2015**, *217*, 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.028>.
- (245) Pereira, B. C.; Isreb, A.; Isreb, M.; Forbes, R. T.; Oga, E. F.; Alhnan, M. A. Additive Manufacturing of a Point-of-Care “Polypill:” Fabrication of Concept Capsules of Complex Geometry with Bespoke Release against Cardiovascular Disease. *Adv. Healthc. Mater.* **2020**, *9* (13), 2000236. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000236>.
- (246) Betz, J. F.; Ho, V. B.; Gaston, J. D. 3D Bioprinting and Its Application to Military Medicine. *Mil. Med.* **2020**, *185* (9–10), e1510–e1519. <https://doi.org/10.1093/milmed/usaa121>.
- (247) Miglierini, G. 3D printing, a disruptive technology still lacking regulatory guidance in the EU <https://www.pharmaworldmagazine.com/3d-printing-a-disruptive-technology-still-lacking-regulatory-guidance-in-the-eu/> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (248) Di Prima, M.; Coburn, J.; Hwang, D.; Kelly, J.; Khairuzzaman, A.; Ricles, L. Additively Manufactured Medical Products – the FDA Perspective. *3D Print. Med.* **2016**, *2* (1), 1. <https://doi.org/10.1186/s41205-016-0005-9>.

- (249) Alhnan, M. A.; Okwuosa, T. C.; Sadia, M.; Wan, K.-W.; Ahmed, W.; Arafat, B. Emergence of 3D Printed Dosage Forms: Opportunities and Challenges. *Pharm. Res.* **2016**, *33* (8), 1817–1832. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1933-1>.
- (250) Hsiao, W.-K.; Lorber, B.; Reitsamer, H.; Khinast, J. 3D Printing of Oral Drugs: A New Reality or Hype? *Expert Opin. Drug Deliv.* **2018**, *15* (1), 1–4. <https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1371698>.
- (251) Aprecia Pharmaceuticals LLC. ZipDose Technology: The world's first 3DP dosage form. <https://www.aprecia.com/technology/zipdose> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (252) Triastek Inc. Triastek. Global leader of 3D printing pharmaceuticals <https://www.triastek.com/indexen.html> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (253) Business Wire Inc. MED™ 3D Printed Pharmaceutical Product Receives IND Clearance From the US FDA <https://www.businesswire.com/news/home/20210209005529/en/MED™-3D-Printed-Pharmaceutical-Product-Receives-IND-Clearance-From-the-US-FDA> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (254) Goyanes, A.; Madla, C. M.; Umerji, A.; Duran Piñeiro, G.; Giraldez Montero, J. M.; Lamas Diaz, M. J.; Gonzalez Barcia, M.; Taherali, F.; Sánchez-Pintos, P.; Couce, M.-L.; Gaisford, S.; Basit, A. W. Automated Therapy Preparation of Isoleucine Formulations Using 3D Printing for the Treatment of MSUD: First Single-Centre, Prospective, Crossover Study in Patients. *Int. J. Pharm.* **2019**, *567*, 118497. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118497>.
- (255) Tagami, T.; Ito, E.; Kida, R.; Hirose, K.; Noda, T.; Ozeki, T. 3D Printing of Gummy Drug Formulations Composed of Gelatin and an HPMC-Based Hydrogel for Pediatric Use. *Int. J. Pharm.* **2021**, *594* (September 2020), 120118. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120118>.
- (256) Barbara Akpanudo, V. S. “Doc, I Just Can’t Swallow Pills”: HIV Infected Patients and Pill Phagophobia. *J. AIDS Clin. Res.* **2014**, *05* (09). <https://doi.org/10.4172/2155-6113.1000348>.
- (257) Beck, M. H.; Cataldo, M.; Slifer, K. J.; Pulbrook, V.; Guhman, J. K. Teaching Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and Autistic Disorder (AD) How to Swallow Pills. *Clin. Pediatr. (Phila)*. **2005**, *44* (6), 515–526. <https://doi.org/10.1177/000992280504400608>.
- (258) Fields, J.; Go, J. T.; Schulze, K. S. Pill Properties That Cause Dysphagia and Treatment Failure. *Curr. Ther. Res.* **2015**, *77*, 79–82. <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2015.08.002>.
- (259) SEFAC. La Fundación SEFAC y el Foro Español de Pacientes lanzan una ficha con recomendaciones para fomentar la adherencia terapéutica <https://www.sefac.org/notas-de-prensa/recomendaciones-para-fomentar-la-adherencia-terapeutica> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (260) Brustugun, J.; Notaker, N.; Paetz, L. H.; Tho, I.; Bjerknes, K. Adjusting the Dose in Paediatric Care: Dispersing Four Different Aspirin Tablets and Taking a Proportion. *Eur. J. Hosp.*

- Pharm.* **2021**, 28 (2), 76–82. <https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2019-001903>.
- (261) Lajoinie, A.; Janiaud, P.; Henin, E.; Gleize, J.-C.; Berlion, C.; Nguyen, K. A.; Nony, P.; Gueyffier, F.; Maucort-Boulch, D.; Kassai Koupaï, B. Assessing the Effects of Solid versus Liquid Dosage Forms of Oral Medications on Adherence and Acceptability in Children. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2017**, 2017 (9). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012783>.
- (262) Volovitz, B.; Duenas-Meza, E.; Chmielewska-Szewczyk, D. A.; Kosa, L.; Astafieva, N. G.; Villaran, C.; Pinacho-Daza, C.; Laurenzi, M.; Jasan, J.; Menten, J.; Leff, J. A. Comparison of Oral Montelukast and Inhaled Cromolyn with Respect to Preference, Satisfaction, and Adherence: A Multicenter, Randomized, Open-Label, Crossover Study in Children with Mild to Moderate Persistent Asthma. *Curr. Ther. Res.* **2000**, 61 (7), 490–506. [https://doi.org/10.1016/S0011-393X\(00\)80032-6](https://doi.org/10.1016/S0011-393X(00)80032-6).
- (263) Gardiner, P.; Dvorkin, L. Promoting Medication Adherence in Children. *Am. Fam. Physician* **2006**, 74 (5), 793–798.
- (264) Brenner, T.; Tuvikene, R.; Fang, Y.; Matsukawa, S.; Nishinari, K. Rheology of Highly Elastic Iota-Carrageenan/Kappa-Carrageenan/Xanthan/Konjac Glucomannan Gels. *Food Hydrocoll.* **2015**, 44, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.016>.
- (265) Liu, X.; Wang, Y.; Yu, L.; Tong, Z.; Chen, L.; Liu, H.; Li, X. Thermal Degradation and Stability of Starch under Different Processing Conditions. *Starch - Stärke* **2013**, 65 (1–2), 48–60. <https://doi.org/10.1002/star.201200198>.
- (266) Marcotte, M.; Taherian Hoshahili, A. R.; Ramaswamy, H. S. Rheological Properties of Selected Hydrocolloids as a Function of Concentration and Temperature. *Food Res. Int.* **2001**, 34 (8), 695–703. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00091-6).
- (267) Parker, R.; Ring, S. G. Aspects of the Physical Chemistry of Starch. *J. Cereal Sci.* **2001**, 34 (1), 1–17. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2000.0402>.
- (268) Zheng, L.; Yu, Y.; Tong, Z.; Zou, Q.; Han, S.; Jiang, H. The Characteristics of Starch Gels Molded by 3D Printing. *J. Food Process. Preserv.* **2019**, 43 (7), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13993>.
- (269) Pineda-Gómez, P.; Coral, D. F.; Arciniegas, L.; Rorales-Rivera, A.; Rodríguez García, M. E. Role of Water in Maize Starch Gelatinization: An Study by Differential Scanning Calorimetry. **2010**, 6 (11), 1794–9165.
- (270) Lascombes, C.; Agoda-Tandjawa, G.; Boulenguer, P.; Le Garnec, C.; Gilles, M.; Mauduit, S.; Barey, P.; Langendorff, V. Starch-Carrageenan Interactions in Aqueous Media: Role of Each Polysaccharide Chemical and Macromolecular Characteristics. *Food Hydrocoll.* **2017**, 66, 176–189. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.025>.

- (271) Rincón-Londoño, N.; Vega-Rojas, L. J.; Contreras-Padilla, M.; Acosta-Osorio, A. A.; Rodríguez-García, M. E. Analysis of the Pasting Profile in Corn Starch: Structural, Morphological, and Thermal Transformations, Part I. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *91* (April), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.070>.
- (272) Kumar, R.; Khatkar, B. S. Thermal, Pasting and Morphological Properties of Starch Granules of Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Varieties. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54* (8), 2403–2410. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2681-x>.
- (273) Hartesi, B.; Sriwido; Abdassah, M.; Chaerunisaa, A. Y. Starch as Pharmaceutical Excipient. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2016**, *41* (2), 59–64.
- (274) Adjei, F. K.; Osei, Y. A.; Kuntworbe, N.; Ofori-Kwakye, K. Evaluation of the Disintegrant Properties of Native Starches of Five New Cassava Varieties in Paracetamol Tablet Formulations. *J. Pharm.* **2017**, *2017*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/2326912>.
- (275) Lille, M.; Nurmela, A.; Nordlund, E.; Metsä-Kortelainen, S.; Sozer, N. Applicability of Protein and Fiber-Rich Food Materials in Extrusion-Based 3D Printing. *J. Food Eng.* **2018**, *220*, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.034>.
- (276) Kuo, C.-C.; Liu, L.-C.; Teng, W.-F.; Chang, H.-Y.; Chien, F.-M.; Liao, S.-J.; Kuo, W.-F.; Chen, C.-M. Preparation of Starch/Acrylonitrile-Butadiene-Styrene Copolymers (ABS) Biomass Alloys and Their Feasible Evaluation for 3D Printing Applications. *Compos. Part B Eng.* **2016**, *86*, 36–39. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2015.10.005>.
- (277) Khaled, S. A.; Burley, J. C.; Alexander, M. R.; Roberts, C. J. Desktop 3D Printing of Controlled Release Pharmaceutical Bilayer Tablets. *Int. J. Pharm.* **2014**, *461* (1–2), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.021>.
- (278) Pacheco-Quito, E.-M.; Ruiz-Caro, R.; Veiga, M.-D. Carrageenan: Drug Delivery Systems and Other Biomedical Applications. *Mar. Drugs* **2020**, *18* (11), 583. <https://doi.org/10.3390/md18110583>.
- (279) Calvo, M. Carragenano <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/carragenano.html> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (280) Ridout, M. J.; Garza, S.; Brownsey, G. J.; Morris, V. J. Mixed Iota-Kappa Carrageenan Gels. *Int. J. Biol. Macromol.* **1996**, *18* (1–2), 5–8. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(95\)01037-8](https://doi.org/10.1016/0141-8130(95)01037-8).
- (281) Necas, J.; Bartosikova, L. Carrageenan: A Review. *Vet. Med. (Praha)*. **2013**, *58* (No. 4), 187–205. <https://doi.org/10.17221/6758-VETMED>.
- (282) Thrimawithana, T. R.; Young, S.; Dunstan, D. E.; Alany, R. G. Texture and Rheological Characterization of Kappa and Iota Carrageenan in the Presence of Counter Ions. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82* (1), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.024>.
- (283) Boyd, M. J.; Hampson, F. C.; Jolliffe, I. G.; Dettmar, P. W.; Mitchell, J. R.; Melia, C. D. Strand-like Phase Separation in Mixtures of Xanthan Gum with Anionic Polyelectrolytes. *Food*

- Hydrocoll.* **2009**, 23 (8), 2458–2467. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.07.008>.
- (284) Bertrand, M.-E.; Turgeon, S. L. Improved Gelling Properties of Whey Protein Isolate by Addition of Xanthan Gum. *Food Hydrocoll.* **2007**, 21 (2), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.03.005>.
- (285) Funami, T.; Noda, S.; Hiroe, M.; Asai, I.; Ikeda, S.; Nishinari, K. Functions of Iota-Carrageenan on the Gelatinization and Retrogradation Behaviors of Corn Starch in the Presence or Absence of Various Salts. *Food Hydrocoll.* **2008**, 22 (7), 1273–1282. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.008>.
- (286) Orenstein, S. R.; Blumer, J. L.; Faessel, H. M.; McGuire, J. A.; Fung, K.; Li, B. U. K.; Lavine, J. E.; Grunow, J. E.; Treem, W. R.; Ciociola, A. A. Ranitidine, 75 Mg, over-the-Counter Dose: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects in Children with Symptoms of Gastro-Oesophageal Reflux. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2002**, 16 (5), 899–907. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2002.01243.x>.
- (287) Sandritter, T. Gastroesophageal Reflux Disease in Infants and Children. *J. Pediatr. Heal. Care* **2003**, 17 (4), 198–205. <https://doi.org/10.1067/mp.2003.59>.
- (288) Chieng, N.; Zujovic, Z.; Bowmaker, G.; Rades, T.; Saville, D. Effect of Milling Conditions on the Solid-State Conversion of Ranitidine Hydrochloride Form 1. *Int. J. Pharm.* **2006**, 327 (1–2), 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.032>.
- (289) Mirmehrabi, M.; Rohani, S.; Murthy, K. S. K.; Radatus, B. Solubility, Dissolution Rate and Phase Transition Studies of Ranitidine Hydrochloride Tautomeric Forms. *Int. J. Pharm.* **2004**, 282 (1–2), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.031>.
- (290) Comité de Medicamentos - Asociación Española de Pediatría (AEP). Ranitidina <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pepiamecum/ranitidina> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (291) Ameen, V. Z.; Pobiner, B. F.; Giguere, G. C.; Carter, E. G. Ranitidine (Zantac??) Syrup versus Ranitidine Effervescent Tablets (Zantac?? EFFERdose??) In Children. *Pediatr. Drugs* **2006**, 8 (4), 265–270. <https://doi.org/10.2165/00148581-200608040-00005>.
- (292) Nahler, G. *Dictionary of Pharmaceutical Medicine*, Fourth.; Springer International Publishing: Cham, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50669-2>.
- (293) Crawford, C.; Anderson, M.; Cooper, G.; Jackson, G.; Thompson, J.; Vale, A.; Thomas, S.; Eddleston, M.; Bateman, D. Overdose in Young Children Treated with Anti-Reflux Medications: Poisons Enquiry Evidence of Excess 10-Fold Dosing Errors with Ranitidine. *Hum. Exp. Toxicol.* **2018**, 37 (4), 343–349. <https://doi.org/10.1177/0960327117705430>.
- (294) Ryu, G. S.; Lee, Y. J. Analysis of Liquid Medication Dose Errors Made by Patients and Caregivers Using Alternative Measuring Devices. *J. Manag. Care Pharm.* **2012**, 18 (6), 439–

445. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2012.18.6.439>.
- (295) Liu, Y.; Yu, Y.; Liu, C.; Regenstein, J. M.; Liu, X.; Zhou, P. Rheological and Mechanical Behavior of Milk Protein Composite Gel for Extrusion-Based 3D Food Printing. *LWT* **2019**, *102* (August 2018), 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.053>.
- (296) Liu, Z.; Zhang, M.; Bhandari, B. Effect of Gums on the Rheological, Microstructural and Extrusion Printing Characteristics of Mashed Potatoes. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *117* (2017), 1179–1187. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.048>.
- (297) Chaisawang, M.; Suphantharika, M. Effects of Guar Gum and Xanthan Gum Additions on Physical and Rheological Properties of Cationic Tapioca Starch. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *61* (3), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.04.002>.
- (298) Datta, S.; Grant, D. J. W. Crystal Structures of Drugs: Advances in Determination, Prediction and Engineering. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (1), 42–57. <https://doi.org/10.1038/nrd1280>.
- (299) Madan, T.; Kakkar, A. P. Preparation and Characterization of Ranitidine-HCl Crystals. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1994**, *20* (9), 1571–1588. <https://doi.org/10.3109/03639049409050198>.
- (300) Universidad de Burgos. Difracción de Rayos X de Polvo (DRX-P) <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/rayos-x/difraccion-de-rayos-x-de-polvo-drx-p> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (301) Nanda, A. Preparation and Characterization of Pva and Carrageenan Based Hydrogels for Biomedical Purposes, National Institute of Technology Rourkela, 2015.
- (302) Wu, V.; Rades, T.; Saville, D. J. Stability of Polymorphic Forms of Ranitidine Hydrochloride. *Pharmazie* **2000**, *55* (7), 508–512.
- (303) CHIENG, N.; AALTONEN, J.; SAVILLE, D.; RADES, T. Physical Characterization and Stability of Amorphous Indomethacin and Ranitidine Hydrochloride Binary Systems Prepared by Mechanical Activation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71* (1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.06.022>.
- (304) Surinach, S.; Baro, M.; Bordas, S.; Clavaguera, N.; Clavaguera-Mora, M. La Calorimetría Diferencial de Barrido y Su Aplicación a La Ciencia de Materiales. *Boletín la Soc. Española Cerámica y Vidr.* **1992**, *31* (1), 11–17.
- (305) Mettler Toledo. Evaluation and interpretation of peak temperatures of DSC curves. Part 1: Basic principles http://www.mt.com/us/en/home/supportive_content/matchar_apps/MatChar_UC242.html (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (306) Ramachandr, S.; Thirumurug, G.; Dhanaraju, M. D. Development and Evaluation of Biodegradable Chitosan Microspheres Loaded with Ranitidine and Cross Linked with Glutaraldehyde. *Am. J. Drug Discov. Dev.* **2011**, *1* (2), 105–120. <https://doi.org/10.3923/ajdd.2011.105.120>.
- (307) Kajjari, P. B.; Manjeshwar, L. S.; Aminabhavi, T. M. Semi-Interpenetrating Polymer Network

- Hydrogel Blend Microspheres of Gelatin and Hydroxyethyl Cellulose for Controlled Release of Theophylline. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *50* (13), 7833–7840. <https://doi.org/10.1021/ie200516k>.
- (308) Palekar, S.; Nukala, P. K.; Mishra, S. M.; Kipping, T.; Patel, K. Application of 3D Printing Technology and Quality by Design Approach for Development of Age-Appropriate Pediatric Formulation of Baclofen. *Int. J. Pharm.* **2019**, *556*, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.062>.
- (309) Ruiz, M. E. La Intercambiabilidad de Medicamentos, Universidad Nacional de la Plata, 2011.
- (310) European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). 2.9.5. Uniformity of Mass of Single-Dose Preparations. In *European Pharmacopoeia. 8.0*; 2013; pp 297–298.
- (311) European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). 2.9.6 Uniformity of Content of Single-Dose Preparations. In *European Pharmacopoeia. 8.0*; 2013; pp 298–299.
- (312) Moffat, A. C.; Osselton, M. D.; Widdop, B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material.*, Fourth edi.; Pharmaceutical Press: London, 2011. https://doi.org/10.1007/978-94-009-8066-2_9.
- (313) Rey, M. E. Bioequivalencia, Biodisponibilidad y EFG. Algunas Consideraciones. In *Farmacia Profesional. Economía y gestión.*; Haymarket, 2001; Vol. 15, pp 88–93.
- (314) The United States Pharmacopeial Convention (USP). Dissolution and Drug Release Tests <https://www.usp.org/chemical-medicines/dissolution> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (315) U.S Food & Drug Administration (FDA). Guía para la Industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guia-para-la-industria-pruebas-de-disolucion-de-formas-de-dosificacion-oral-solidas-de-liberacion> (accedido 1 de noviembre de 2021).
- (316) Xu, H.; Shi, M.; Liu, Y.; Jiang, J.; Ma, T. A Novel In Situ Gel Formulation of Ranitidine for Oral Sustained Delivery. *Biomol. Ther. (Seoul)*. **2014**, *22* (2), 161–165. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2013.109>.
- (317) Domínguez, P. Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada y Estereoisómeros ¿Nos Aportan Algo En La Práctica Clínica? *Bol. Inf. Farmacoter. Navarra* **2005**, *13* (1), 1–10.

Anexos

Para la visualización de parte de los archivos contemplados como anexos se requiere de un software específico que se detalla a continuación:

- **TRIOS Software.** Programa para la recopilación, la visualización y el análisis de los datos de reología. Disponible para su descarga gratuita en el sitio web de TA Instruments (<https://www.tainstruments.com/support/software-downloads-support/downloads/>).
- **VLC Media Player.** Reproductor de videos en múltiples formatos (MP4, MOV, WMV...). Disponible para su descarga gratuita en <https://vlc-media-player.uptodown.com/windows/descargar>.
- **ABViewer.** Visualizador de archivos tipo .STL. Disponible para su descarga gratuita en <https://3d-viewers.com/es/stl-viewer.html>.

I. Capítulo 2

REOLOGÍA

Debido a su extensión, los datos de los ensayos reológicos realizados en esta Tesis se encuentran recopilados en formato .trios y disponibles únicamente en formato digital.

VÍDEOS

Debido a su formato, los vídeos correspondientes a este capítulo se encuentran disponibles en formato digital.

ARCHIVOS STL

Debido a su formato, los archivos .STL correspondientes a este capítulo se encuentran disponibles en formato digital.

II. Capítulo 3

REOLOGÍA

Debido a su extensión, los datos de los ensayos reológicos realizados en esta Tesis se encuentran recopilados en formato .trios y disponibles únicamente en formato digital.

VÍDEOS

Debido a su formato, los vídeos correspondientes a este capítulo se encuentran disponibles en formato digital.

ARCHIVOS STL

Debido a su formato, los archivos .STL correspondientes a este capítulo se encuentran disponibles en formato digital.

III. Capítulo 4

REOLOGÍA

Debido a su extensión, los datos de los ensayos reológicos realizados en esta Tesis se encuentran recopilados en formato .trios y disponibles únicamente en formato digital.

VÍDEOS

Debido a su formato, los vídeos correspondientes a este capítulo se encuentran disponibles en formato digital.

ARCHIVOS STL

Debido a su formato, los archivos .STL correspondientes a este capítulo se encuentran disponibles en formato digital.

TERMOGRAMAS

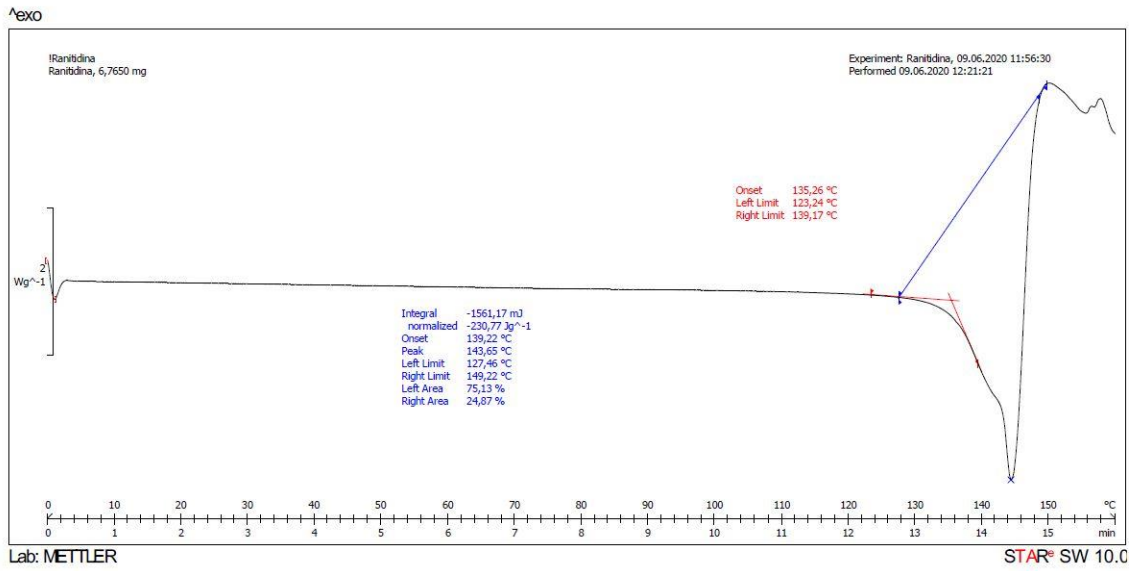


Figura AIII.1. Termograma del clorhidrato de ranitidina a 10 °C/min.

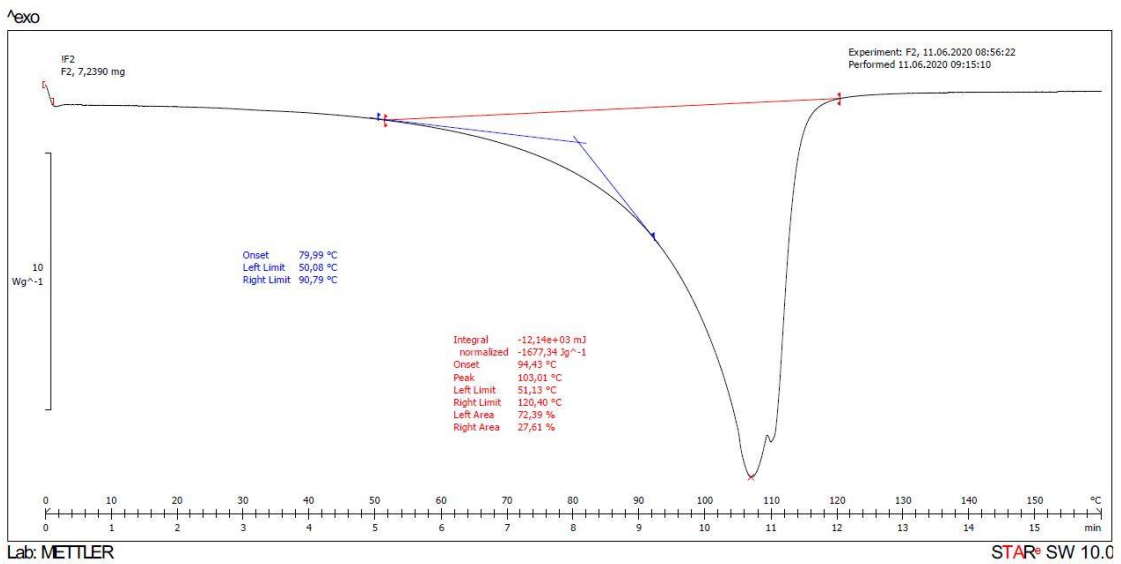


Figura AIII.2. Termograma de F2 a 10 °C/min.

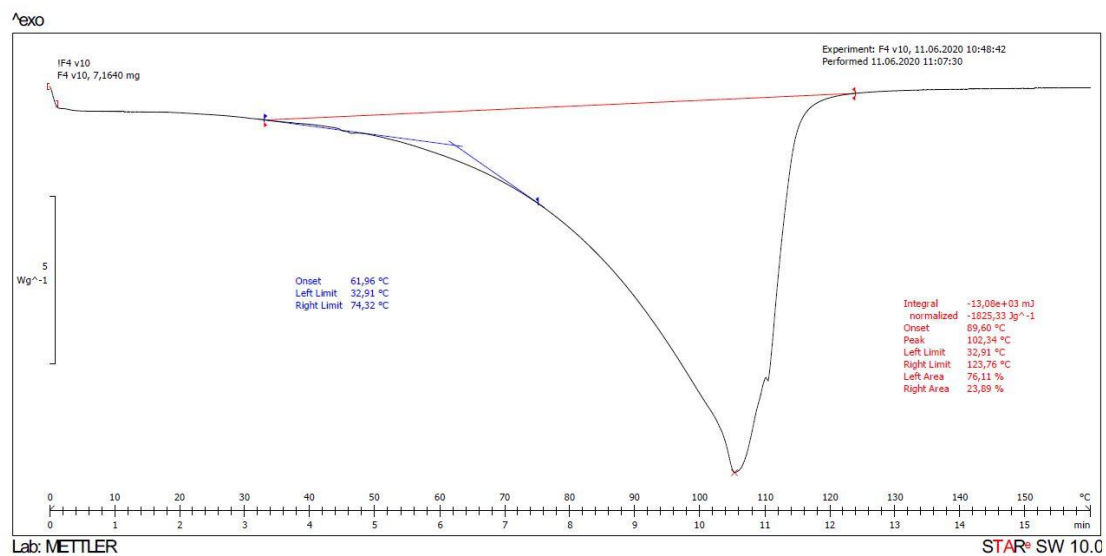


Figura AIII.3. Termograma de F4 a 10 °C/min.

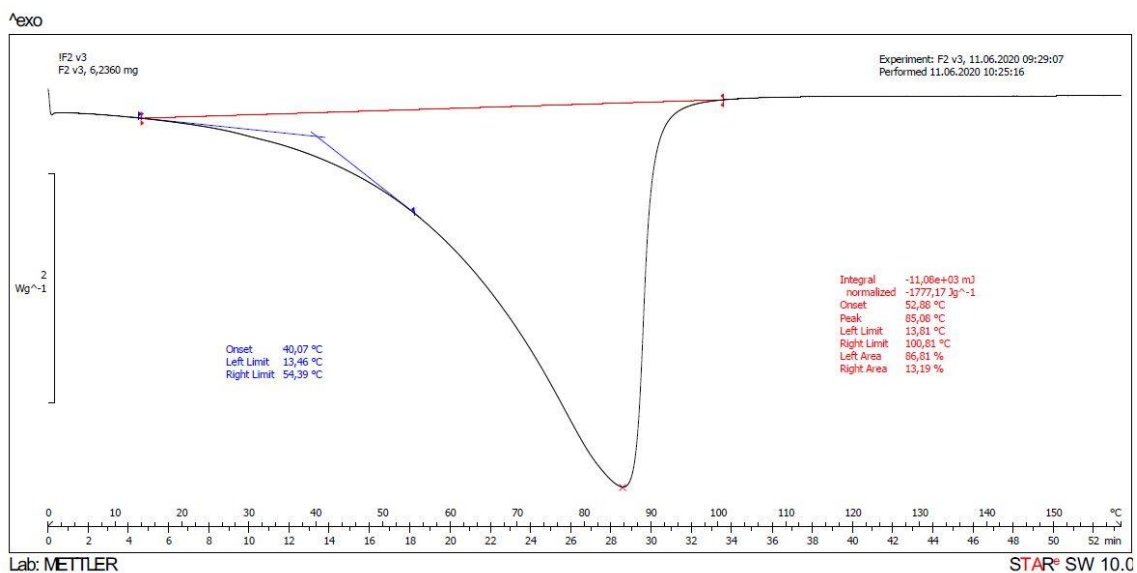


Figura AIII.4. Termograma de F2 a 2 °C/min.

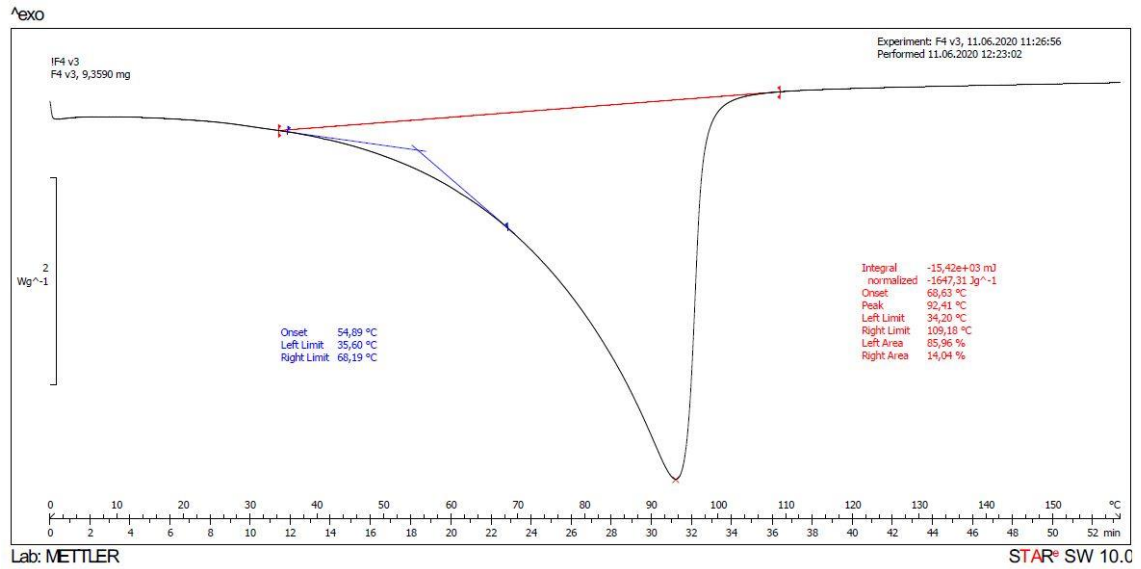


Figura AIII.5. Termograma de F4 a 2 °C/min.

Publicaciones

Los resultados de los Capítulos 2, 3 y 4 han sido recopilados, respectivamente, en las tres publicaciones siguientes:

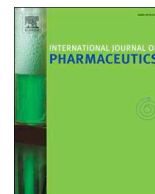
- Herrada-Manchón, H.; Celada, L.; Rodríguez-González, D.; Fernández, M. A.; Aguilar, E.; Chiara, M.-D. Three-Dimensional Bioprinted Cancer Models: A Powerful Platform for Investigating Tunneling Nanotube-like Cell Structures in Complex Microenvironments. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *128*, 112357. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112357>.
- Herrada-Manchón, H.; Rodríguez-González, D.; Fernández, M. A.; Kucko, N. W.; Barrère-de Groot, F.; Aguilar, E. Effect on Rheological Properties and 3D Printability of Biphasic Calcium Phosphate Microporous Particles in Hydrocolloid-Based Hydrogels. *Gels* **2022**, *8* (1), 28. <https://doi.org/10.3390/gels8010028>.
- Herrada-Manchón, H.; Rodríguez-González, D.; Fernández, M. A.; Suñé-Pou, M.; Pérez-Lozano, P.; García-Montoya, E.; Aguilar, E. 3D Printed Gummies: Personalized Drug Dosage in a Safe and Appealing Way. *Int. J. Pharm.* **2020**, *587*, 119687. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119687>.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

3D printed gummies: Personalized drug dosage in a safe and appealing way

Helena Herrada-Manchón^{a,b,*}, David Rodríguez-González^{a,b}, M. Alejandro Fernández^b,
Marc Suñé-Pou^{c,d}, Pilar Pérez-Lozano^{c,d}, Encarnación García-Montoya^{c,d}, Enrique Aguilar^a

^a Centro de Innovación en Química Avanzada (ORFEO-CINQA), Instituto Universitario de Química Organometálica "Enrique Moles", Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Universidad de Oviedo, C/ Julián Clavería, 8, 33006 Oviedo, Asturias, Spain

^b Fundación Idonial, Parque Científico y Tecnológico de Gijón, Avda. Jardín Botánico, 1345, 33203 Gijón, Asturias, Spain

^c Departament de Farmàcia, Tecnologia Farmacèutica i Fisicoquímica, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII, 27-31, 08028 Barcelona, Spain

^d IDIBELL-UB Research Group, Pharmacotherapy, Pharmacogenomics and Pharmaceutical Technology, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Personalized medicine
3D printed drugs
3D printed gummies
Medication adherence
Ranitidine hydrochloride

ABSTRACT

Obtention of customized dosage forms is one of the main attractions of 3D printing in pharmaceuticals. In this sense, children are one of the groups within the population with a greater need for drug doses adapted to their requirements (age, weight, pathological state...), but most 3D printed oral dosages are solid forms and, therefore, not suitable for them. This work developed patient-tailored medicinal gummies, an alternative oral dosage form with eye-catching appearance and appropriate organoleptic characteristics. Four inks were formulated, characterised and 3D printed by means of syringe-based extrusion mechanism. Different tests were performed to ensure reproducibility of the process and validate work methodology for dosage unit fabrication applying basic manufacturing standards. Rheological test helped in evaluating inks printability. Visual characterization concluded that gummies, apart from a high fidelity in the 3D model shape reproduction, had a bright and uniformly coloured appearance and a pleasant aroma, which made them highly appetising and attractive. The printed gummy oral dosages complied comfortably with the mass uniformity assay regardless of the formulated ink used or the 3D model selected for printing. Ranitidine hydrochloride individual contents were determined using uv-vis spectrophotometry, showing successful results both in dose accuracy, uniformity of drug content and dissolution.

1. Introduction

Inter-individual variability, due to both genetic and environmental factors, makes drug response different between patients (Schork, 2015). For this reason, concepts of "patient-specific" or "tailored" dosing are emerging as an alternative to the traditional pharmaceutical industry mass production. In this sense, 3D printing has proved to be a manufacturing technique with great potential since it allows the creation of three-dimensional objects, layer by layer, with total freedom of form and design (Awad et al., 2018; Norman et al., 2017; Trenfield et al., 2018). Thus, dosages adapted to each patient can be printed without incurring additional costs since the easily modification of the infill density or the size of the figure allow the acquisition of the desired drug dose with no need of ink reformulation. Moreover, through these manufacturing technologies, complex custom shapes can be achieved, providing an alternative potential to the release and absorption profiles of drugs (Goyanes et al., 2016, 2015a; Okwuosa et al., 2017; Sadia

et al., 2018), as well as pills containing multiple drugs with defined immediate and sustained release profiles (Goyanes et al., 2015b; Khaled et al., 2015a, 2015b).

Just as happens with conventional-manufactured medicines, most of published works on 3D printed medicines respond to solid oral formulations that must be swallowed whole, except for some alternative approaches to chewable doses (Goyanes et al., 2019; Rycerz et al., 2019). Solid oral dosages, although widely accepted by society, are inconvenient for patients with swallowing difficulties or uncooperative, such as children or old people. The lack of will to swallow solid forms is also common in healthy adults, who do not communicate it to doctors, and the treatment ends up failing without considering alternative therapy solutions. In all these cases, compliance and medication adherence are directly affected, contributing to a greater occurrence of medical complications and decreasing patient's quality of life (Barbara Akpanudo, 2014; Beck et al., 2005; Fields et al., 2015).

This work presents a novel option to enhance the complacency and

* Corresponding author at: Fundación Idonial, Parque Científico y Tecnológico de Gijón, Avda. Jardín Botánico, 1345, 33203 Gijón, Asturias, Spain.

E-mail address: helena.herrada@idonial.com (H. Herrada-Manchón).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119687>

Received 30 April 2020; Received in revised form 18 July 2020; Accepted 20 July 2020

Available online 27 July 2020

0378-5173/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

willingness of the end-user customer to take the medication as planned: patient-tailored medicinal gummies or 'drugmies'; a dosage form with eye-catching appearance and appropriate organoleptic characteristics that can improve treatment adherence and reduce psychological impact of the disease, especially in children (Gardiner and Dvorkin, 2006; Lajoie et al., 2017; Volovitz et al., 2000).

With this aim, new semi-solid drug-loaded inks had been developed and printed through syringe-based extrusion 3D printing, an additive manufacturing technology where a programmed stepper motor moves a plunger with a linear motion and extrusion rate is controlled through motor velocity (Guo et al., 2019). In extrusion 3D printing, rheological properties of the materials chosen as printing inks are considered a key factor in controlling the printability and crucial to create figures with precise geometries. In this sense, it has been widely reported that shear-thinning and thixotropic fluids are highly desirable (Azam et al., 2018; Li et al., 2016; Y. Liu et al., 2019a; Z. Liu et al., 2019b; Yang et al., 2018), as they can be easily extruded through a narrow nozzle and then, rapidly recover the viscosity and mechanical strength necessary to support the next layer extruded.

The formulated thermo-reversible inks combine several hydrocolloids and common gelling agents (Brenner et al., 2015; Liu et al., 2013; Saha and Bhattacharya, 2010) with an Active Pharmaceutical Ingredient (API). In this case, the API selected was ranitidine hydrochloride, an histamine-2 receptor antagonist (H2RA) that inhibits gastric acid secretion, thereby reducing gastric contents volume and increasing intragastric pH (Orenstein et al., 2002; Sandritter, 2003). The drug exhibits polymorphism and has been reported to exist in two crystalline states, named form 1 and form 2, although bioavailability and therapeutic efficacy of both forms are equivalent (Chieng et al., 2006; Mirmehrabi et al., 2004). Ranitidine is a first-line treatment for peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease in children, with a variable dosage depending on the age, weight, and clinical condition of the patient. Some European countries have a specific medicinal product for children, commonly a syrup containing 15 mg/ml of ranitidine (Ameen et al., 2006). In other countries, instead, ranitidine syrup is an officinal formula –a product made in the pharmacy following the pharmacopoeia prescriptions (Nahler, 2017)–, delaying the start of treatment due to its elaboration process. Moreover, dosage of oral liquids has been carried traditionally with calibrated dosing cups, dosing spoons or syringes, which although they are an inexpensive solution, have been associated with human errors that compromise proper dosage and patient safety (Crawford et al., 2018; Ryu and Lee, 2012).

The need of personalize the dose according to the patient and their requirements, the lack of commercial options available and the high rate of human error in dosing, make ranitidine hydrochloride the perfect candidate to show the possibilities of 3D printing technologies as alternative to generate drugmies dosages, and the corresponding validation of this work methodology for dosage unit fabrication applying basic manufacturing standards and studies.

2. Materials and methods.

2.1. Materials.

Ranitidine hydrochloride (CAS no. 66357–59-3), xanthan gum (CAS no.11138–66-2), strawberry essence and purified water (CAS no.7732–18-5) were purchased from Fagron Ibérica SAU, Terrassa, Spain. Gelatin, from porcine skin (CAS no. 9000–70-8) was purchased from Sigma-Aldrich Química S.L., Tres Cantos, Madrid. Carrageenan (Gelification Iota®) was acquired through Guzmán Gastronomía SL, Barcelona, Spain. Corn starch (Maizena®, Unilever España S.A), liquid sweetener (Edulcorante de mesa líquido, Hacendado), food colouring (Colorante alimentario Vahiné®, McCormik España S.A.) and deionized water (Agua desionizada 5L, Auchan Retail España S.L.) were purchased from a local convenience store. Quantitative paper filters

Table 1
Detailed composition of the inks.

	F1	F2	F3	F4
	R(-)CS(+)	R(+)CS(+)	R(-)CS(-)	R(+)CS(-)
Ranitidine HCl (g)	0	1.004	0	1.004
Corn starch (g)	1.500	1.500	0	0
Carrageenan (g)	0.600	0.600	0.600	0.600
Xanthan gum (g)	0.075	0.075	0.075	0.075
Gelatine (g)	2.400	2.400	2.400	2.400
Liquid sweetener (g)	1.000	1.000	1.000	1.000
Strawberry essence (g)	0.150	0.150	0.150	0.150
Food colouring (g)	0.150	0.150	0.150	0.150
Purified water (to 30 g)	24.125	23.121	25.625	24.621

*In the codes listed for formulation column; R and CS stands for ranitidine hydrochloride and corn starch, respectively.

(A070603, Prat Dumas, France) used in analytical tests were purchased to Labbox Labware S.L., Vilassar de Dalt, Spain.

2.2. Ink preparation.

Four different thermo-reversible inks were prepared by combining different hydrocolloids and other well-known gelling agents. Compositions differed mainly in the presence or absence of corn starch and ranitidine among all the ingredients (Table 1). Sweeteners and other excipients were used to improve the organoleptic characteristics and palatability of the formula.

Firstly, gelatin was hydrated with purified water and melted in a bath at 40 ± 2 °C. Meanwhile, required amount of ranitidine and corn starch (if needed) were dissolved in purified water and gradually added to a container with the weighed quantity of carrageenan and xanthan gum. Once a homogeneous paste was formed, molten gelatin was added and gently mixed. Finally, strawberry essence, liquid sweetener and food colouring were incorporated to the mix. Slow manual mixing during all the process is highly recommended to avoid air incorporation to the ink.

The formula was left at rest in a bath at 60 ± 2 °C for 60 min, until the bubbles disappeared. Inks containing corn starch were maintained at 70 ± 2 °C for 60 min to enable starch gelatinization. During this time, the container was wrapped with food grade plastic protective film to prevent the water loss.

Printer-compatible syringes (BD 3 ml Syringe Luer-Lok™Tip; Benton, Dickinson and Company, Belgium) were filled while inks remained hot (liquid) and stored in the fridge at 4 °C until use.

2.3. Rheological analysis.

Rheological characterization of ink samples was carried out with a controlled stress rheometer (Discovery HR-2, DHR, TA Instruments, USA) equipped with a parallel plate (25 mm diameter, 1 mm gap) and a controlled convection/radiant heating oven for stable temperature control (Environmental Test Chamber, ETC, TA Instruments, USA).

The formulations were warmed up in a 30 °C bath during 30 min before testing to form a more flowable state that would allow them to be handled without excessively damaging the internal structure of the fluid and preventing air entrapment. A plastic spatula was used to load samples with same amount of ink (0,5ml approximately).

The shear-viscosity tests were conducted in flow ramp mode with the shear rate increasing from 0.01 to 100 1/s within 120 s at temperatures of 23 °C and 37 °C. Thixotropy was measured at 37 °C through a shear recovery tests consisting in 3 different steps: a low shear rate of 0.4 1/s for 120 s, followed by a high shear rate at 100 1/s for 40 s and finally, a low shear rate of 0.4 1/s for 120 s. Structural regeneration of inks was determined as the percentage of viscosity obtained during the first 40 s and the 120 s in the third step (after high shear rate), based on the average viscosity obtained in the last 40 s of the first step, where

equilibrium viscosity was reached. Linear viscoelastic behaviour was studied using small-amplitude oscillatory shear (SAOS) tests. As a previous step to obtaining the mechanical spectra or frequency sweeps, the linear viscoelastic interval (LVR) was determined by means of amplitude sweeps in a strain interval of 0.1 to 100% and at a fixed frequency of 1 Hz. Frequency sweep analysis were performed at 23 °C and 37 °C, with angular frequency ranging from 0.1 to 10 rad/s at a constant deformation of 0.5% strain (within the linear viscoelastic range, LVR).

In every test, average data of three replicates were used to plot the curves. Results were recorded and processed by a Trios software (Trios Rheology Software, TA Instruments, USA).

2.4. Drug characterization.

2.4.1. Differential scanning calorimetry (DSC).

Samples of pure ranitidine hydrochloride and drug-containing inks (F2 and F4), were thermally analysed using differential scanning calorimeter (DSC). Thermograms were obtained using a DSC822e Differential Scanning Calorimeter (Mettler-Toledo, USA), under a nitrogen gas flow of 50 ml/min. Samples were crimped in an aluminium sample pan and heated at a rate of 3 °C/min and 10 °C/min from 0 to 160 °C.

2.4.2. X-ray diffraction (XRD).

XRD analysis was performed using a X'Pert Pro MPD X-ray diffractometer (PANalytical, UK). The samples of pure ranitidine hydrochloride and drug-loaded inks (F2 and F4) were filled into a zero-background sample holder (ZBH), compressing them to obtain smooth and uniform surfaces. Measurements were carried out from 5 to 50° 2 θ , at a constant scanning speed of 0.02°/s.

2.5. 3D printing process.

Drugmies were manufactured using a syringe-based extrusion 3D printer (bIDO-I, Idonial Technological Center, Spain) (Fig. 1). Stereolithography models (.STL files) were downloaded from MakerBot's Thingiverse, an open platform with Creative Commons licensed designs. Three different figures –disk shaped tablet, heart, and gummy bear– were used (Supplementary Data, Fig.S1). Open source slicing software (Slic3r) was employed to convert stereolithography (.stl) format files to .gcode extension files, the printer readable format. The same temperatures (37 ± 2 °C for the printhead and 15 ± 2 °C for the printing bed) and main printing parameters (8 mm/s nozzle moving speed, rectilinear infill pattern and 45° infill angle) were set for all

figures except layer height and infill density. Layer height was reduced from 0.50 mm to 0.45 mm for acquiring a greater definition in more complex figures. Furthermore, in order to create two drugmies with same appearance but different final weight, gummy bear 3D model infill density was reduced from 80% to 65% to print some batches. Disk and heart-shaped figures had a fixed 80% infill density value. An extended list of printing parameters is included in [Supplementary Data](#). Stainless steel, blunt end dispenser tips (Fisnar, United Kingdom) with 0.51 mm inner diameter (21G) were used as printing nozzles. Prior to printing process, ink syringes were tempered by introducing them in a 37 °C bath for 30 min. Print head temperature was set up to 37 °C to keep the ink fluid enough to be extruded through the nozzle and correctly draw the paths made by the printer. Print bed temperature was adjusted to 15 °C to ensure ink temperature-induced gelification in situ. A thermographic camera (Optris® PI 230; Optris GmbH, Germany) allowed the visualization of fluid-to-solid inks transition. Flat glass pieces were used as printing support to remove the figures easily from the printing bed, facilitate cleaning tasks and reduce waiting time between printing process.

2.6. Mass uniformity assay of 3D printed gummy oral dosages.

Twenty figures of each 3D model (disk, heart, gummy bear 65% and gummy bear 80%) were printed using the same formula (R(-)CS(+)) and weighed individually using a digital precision balance (FH-200, GRAM, Spain) to test the mass uniformity regardless of the 3D design chosen. Also, mass uniformity independently of the ink used was checked by printing twenty more figures of R(+)CS(+), R(-)CS(-) and R(+)CS(-), each with a different 3D model (heart, gummy bear 80% and gummy bear 65%, respectively). Different and random cartridges (syringes) were chosen within the same batch to print each of the figures. Making an approach to European Pharmacopoeia technical procedures, average mass was determined, and individual mass deviations were checked based on the monograph 'Uniformity of mass of single-dose preparations' (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), 2013a). In this method, the products failed if greater than 2 of the individual tablet weights deviated by more than 5% from the average weight and, if one tablet weight deviated by more than 10% from the average weight. The assay applicable to tablets was chosen as there is no specific one for chewable tablets.

2.7. Visual characterization and handling of drugmies.

The visual appearance of mass uniformity assay printed figures (section 2.6) was analysed to assess the organoleptic characteristics and

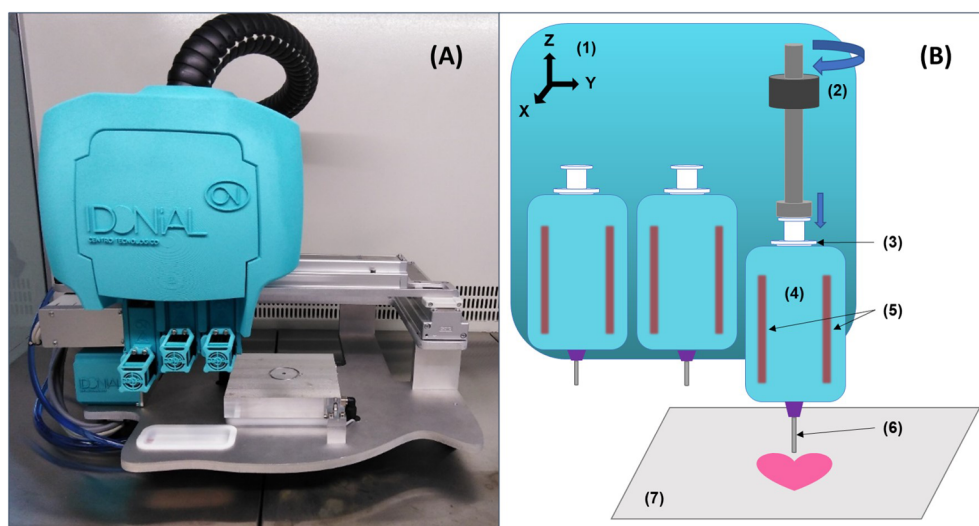


Fig. 1. (A). Photograph of bIDO-I 3D printer. (B). Schematic diagram of bIDO-I 3D printer: (1) Movable print head support (X-Y-Z motion). (2) Syringe-based extrusion unit. (3) Syringe (ink reservoir) and plunger. (4) Individual print head. (5) Print head temperature regulation system. (6) Nozzle. (7) Thermo-regulated print bed.

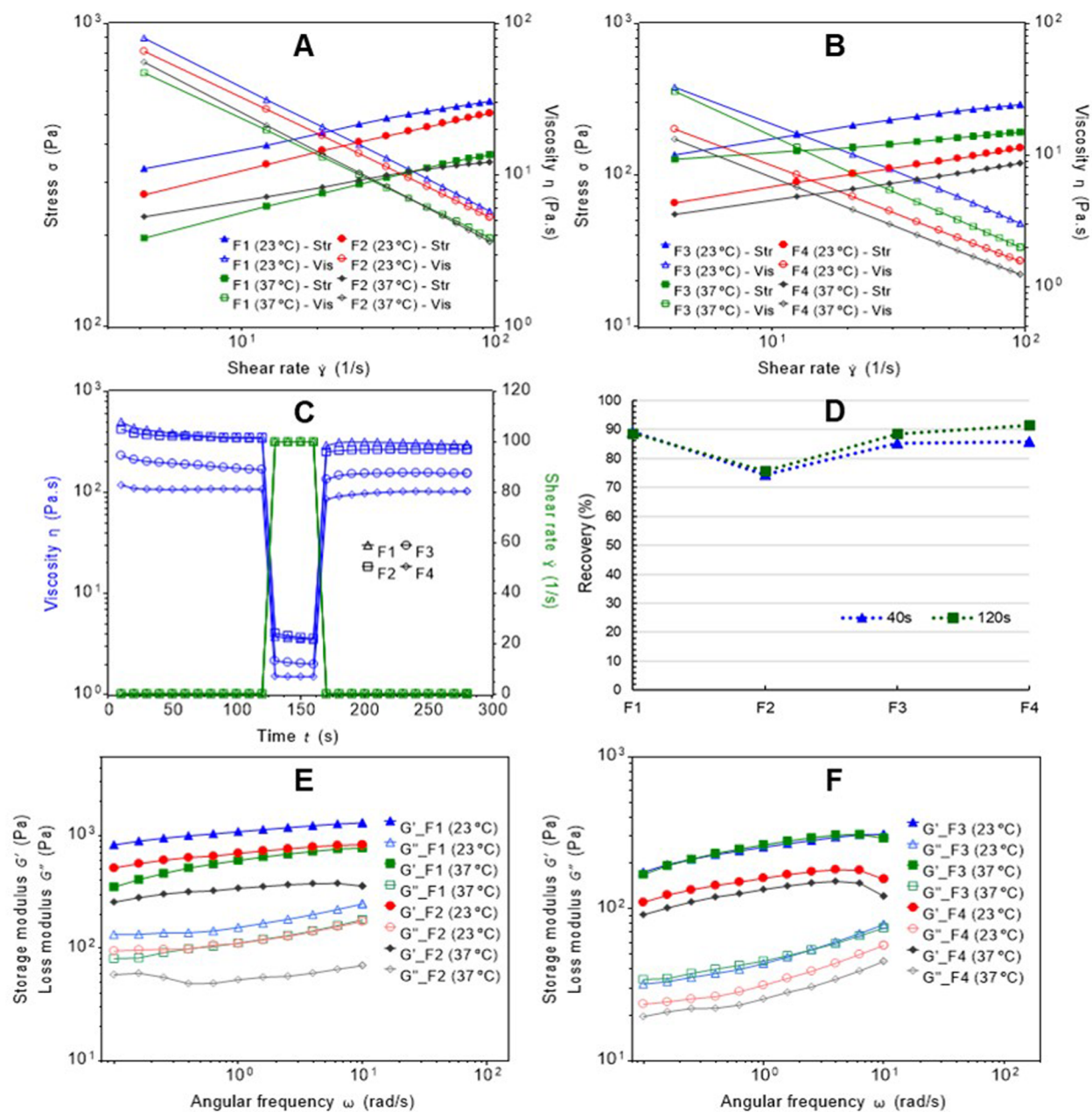


Fig. 2. Rheological tests: (A-B) Shear stress and viscosity profiles (flow curves) for the inks from 0.01 to 100 1/s within 120 s at temperature of 23 °C and 37 °C. (C-D) Shear recovery test for inks thixotropy evaluation and percentage of viscosity recovery of the inks 40 s and 120 s after a high shear rate. (E-F) Storage modulus (G') and loss modulus (G'') of different inks conducted at 23 °C and 37 °C.

to check the level of accuracy in the 3D model reproduction and design reproducibility. Handling of gummy dosages was straightforward tested, checking if figures remained undamaged when were removed from the printing bed and if they could be easily manipulated with the hands without leaving any remains that may lead to a loss of dosage drug content.

2.8. Drug content analysis of 3D printed gummy oral dosages.

For ranitidine containing inks ((R(+))CS(+)) and R(+))CS(-)), drug individual contents of ten dosage units were determined using uv-vis spectrophotometry (Agilent Cary 60 UV-Vis, Agilent, United States). Food colouring was not included in these batches to ensure a proper quantification. Colorant λ_{max} determinations are available in [Supplementary Data](#). Different and random syringes were chosen within the same batch to print each of the figures.

2.8.1. Linearity and calibration curve of ranitidine.

A standard ranitidine stock solution was prepared diluting an accurate amount of 10 mg of ranitidine in 100 ml of deionized water. Seven dilutions (D1-D7) were obtained by transferring different aliquots of 100 $\mu\text{g/ml}$ stock solution to volumetric flasks and diluted to mark with deionized water. One of the dilutions (D6, 16 $\mu\text{g/ml}$) was scanned between 200 and 400 nm and λ_{max} at 313.0 nm was determined, same as reported in bibliography ([Moffat et al., 2011](#)). A calibration curve for ranitidine was obtained by measuring the absorbance of D1-D7 dilutions at the λ_{max} ([Fig.S10](#)). All lectures were carried out in triplicates.

2.8.2. Determination of dosage drug content.

In order to assess the ranitidine content of the drugmies, each unit was weighed and diluted in deionized water in a 500 ml volumetric flask, just after being printed. The flask was kept in a 37 °C bath with

magnetic stirring (850 rpm) until the gummy dosage was completely dissolved (30 min). Then, a filtered aliquot of 1 ml was diluted in 20 ml of deionized water and measured at λ_{\max} to determine ranitidine concentration. All lectures were carried out in triplicates.

2.8.3. Evaluation of content uniformity.

Technical procedures of the European Pharmacopoeia were taken as a reference to assess whether the individual ranitidine contents were within limits set with reference to the average content of the printed gummies sample.

Specifically, the Ph. Eur. monograph 'Uniformity of content of single-dose preparations' method was employed to determine the uniformity of content. In this standard, the preparation complies with the test if each individual content is between 85% and 115% of the average content. The preparation fails if more than one individual content is outside these limits or if one individual content is outside the limits of 75% to 125% of the average content (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), 2013b; Madathilethu et al., 2018). Again, the test suitable to tablets was chosen as chewable tablets do not have a specific one.

2.9. Dissolution testing.

Drug release profiles from printed gummies were determined with a USP-II apparatus (Erweka D700, Germany). The dissolution method from USP monograph for ranitidine tablets (USP 43-NF 38) was used, as no specific assay is established for chewable dosages. For this assay, USP tolerances establish that not less than 80% of the contained amount of ranitidine must be dissolved in 45 min. Each dosage, containing about 30 mg of ranitidine, was placed in a vessel with purified water as the dissolution media (900 ml), maintained at 37 ± 0.5 °C with a stirring rate of 50 rpm. Samples were taken at 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min; and filtered previous determination of the amount of dissolved ranitidine through uv-vis spectrophotometry (Specord 205, Analytical Jena, Germany). Six dosages of each ranitidine loaded ink (R(+)-CS(+) and R(+)-CS(-)) were analysed. Again, food colouring was not included to ensure a proper ranitidine quantification.

3. Results

3.1. Rheological characterization and printability assessment of the inks

For the preparation of drugmies, four inks were formulated and used in different tests to ensure process reproducibility and validate work methodology. Two of them contained ranitidine hydrochloride as active pharmaceutical ingredient and the other two were used as a control to observe how API presence affected inks printability or final printed figure characteristics.

The flow curves (Fig. 2A-B) reflected shear thinning behaviour of the inks, highly convenient for fluids to be extruded through a nozzle. Also, thermo-reversible behaviour was demonstrated since viscosity values fell with temperature increase. Both properties were pursued in the selection of formula components and were quite expected as they are common in gelatin or carrageenan-based gels. Shear recovery tests (Fig. 2C-D) revealed strong thixotropic behaviour of the inks since all the formulas were able to rapidly build up large percentage of their viscosity; which was substantially reduced after the exposure to a high shear rate (100 1/s) during 40 s. A fact of special relevance was that, both in flow curves and in thixotropy tests, F1 (R(-)-CS(+)) and F2 (R(+)-CS(+)) had almost the same rheological behaviour. In this way, it could be assumed that the corn starch contained in the formula cushioned the effect that ranitidine hydrochloride had on the fluid rheology which, by contrast, was clearly observed in non-starch inks (F3 vs F4). Regarding the SAOS tests, firstly, the amplitude sweeps were used to determine the linear viscoelastic region (LVR) of the different inks and thereby ensure that all the oscillatory tests were carried out without

destroying the internal structure of the sample (Supplementary data, Fig. S2). The frequency sweeps (Fig. 2E-F) showed that the inks had viscoelastic properties with a typical weak-gel behaviour, since storage modulus (G') values were higher than loss modulus (G'') values, regardless of the formulation chosen or the temperature at which the measurements were made. In parallel, it was observed that the addition of corn starch caused higher storage modulus values, which are related to a better self-supporting ability and higher mechanical strength of the ink (Huang, 2018; Li et al., 2016; Liu et al., 2018).

3.2. Drug characterization

The physical form of ranitidine hydrochloride within the formulated inks was investigated using thermal and diffractometry methods. Thermal analysis (DSC) of ranitidine hydrochloride exhibited a peak at 143–145 °C, corresponding to the melting point and confirming the crystalline state of the drug (Chieng et al., 2009, 2006; Ramachandran et al., 2011). In the case of the drug-loaded inks, thermograms with a heating rate of 10 °C/min showed overlapped peaks which disappeared with a slower heating rate (Supplementary data, Fig. S12-S13). In thermograms made at 3 °C/min only a broad endothermic transition was observed around 90 °C (Fig. 3A), probably due to the loss of moisture, suggesting that ranitidine was present as a solid solution or amorphized state within the ink matrix (Kajjari et al., 2011; Palekar et al., 2019). In that way, X-ray diffractograms of pure ranitidine exhibit characteristic intense peaks at $2\theta = 20^\circ$ and 23.5° , also representing the crystalline nature of the drug specifically in form 2. Again, these characteristic peaks were not observed in the formulated inks (Fig. 3B) indicating the conversion of ranitidine to the amorphous form (Chieng et al., 2006; Skowrya et al., 2015).

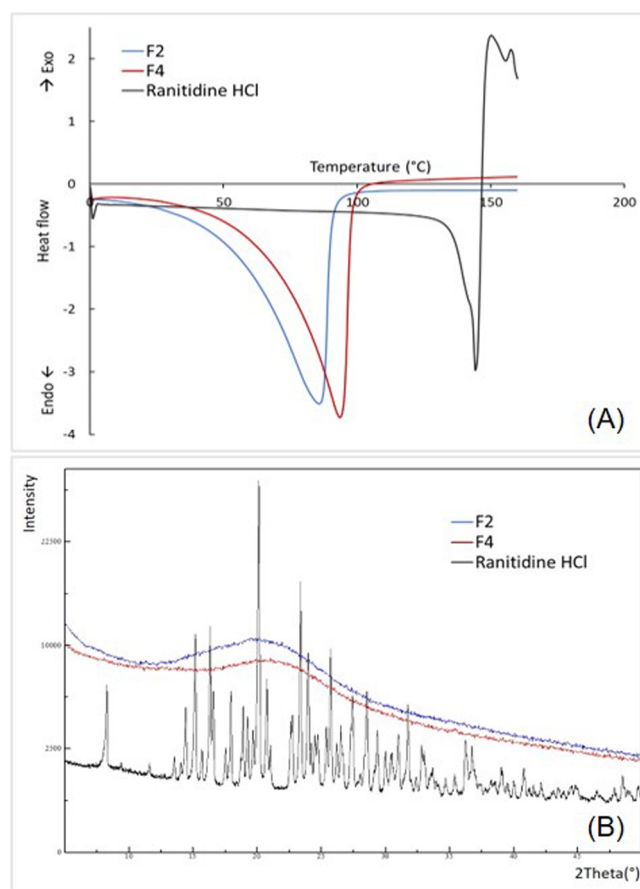


Fig. 3. DSC thermograph (A) and XRD spectra (B) of pure ranitidine hydrochloride and ranitidine-containing inks (F2 and F4).

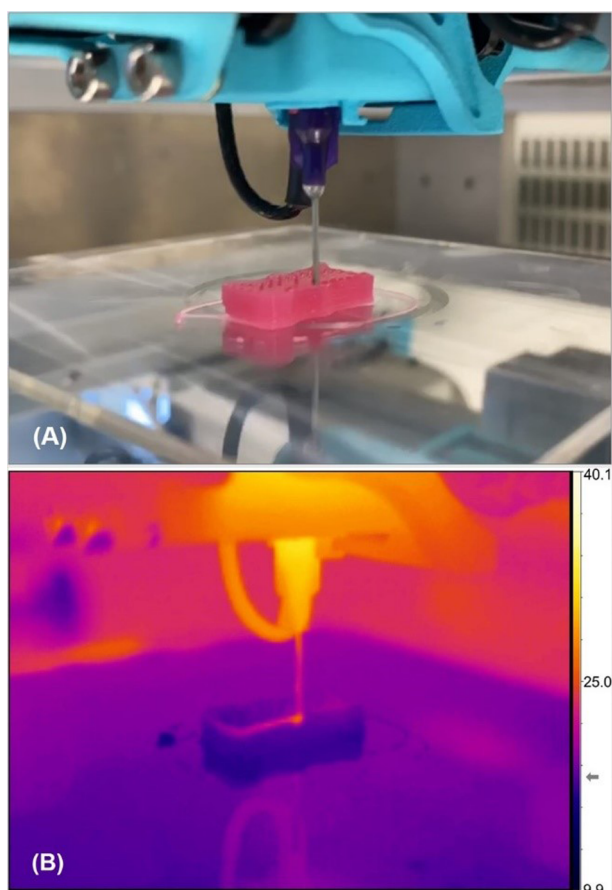


Fig. 4. (A) Printing process of a gummy dosage. (B) Thermographic image of the temperature-induced in situ gelation of the ink.

3.3. Printing process and visual analysis of drugmies.

All the inks could be used to produce different models of 3D printed drug dosages (Supplementary data, Videos V1-V4). Print head and print bed temperature regulation system enabled the management of inks thermo-responsive behaviour, reducing the viscosity by means of a higher temperature in the syringe and a rapid induced gelification in a cold fabrication platform for a solid-state recovery of the ink (Fig. 4). A review of printed figures appearance was made taken different 3D models (disk, heart, gummy bear) and formulas into consideration (Supplementary data, Tables S8-S9). All the gummy oral dosages printed reproduced the 3D models with very high fidelity, as projected and measured sizes were almost equal (Table 2). The visual appearance of the ink was influenced by the presence of corn starch, obtaining a whitish-pastel shade coloured inks, less transparent than the starch-free formulas. Otherwise, the presence of the ranitidine hydrochloride did not vary inks colour. In any case no particles, spots or heterogeneously coloured parts were seen, confirming both the suitability of the formula and its elaboration process.

The printing parameters introduced in the slicing program established the final appearance of the figure, determining points such as the

level of detail obtained or the smoothness of the surface. Simpler figures with flat final surface, like heart and disk models, only had a smooth surface finish if the top layer parameter was set to 'solid' —which means that infill density of the layer is 100%—. Solid top layer was not relevant in printed gummy bears, which had a higher level of details in the final layers. Layer height reduction in gummy bear 3D model-derived dosages helped in the acquisition of a greater figure definition. Moreover, drugmies from same 3D model were visually identical to the point that any possible defect or mark derived from the printing process appeared in all figures equally (Supplementary data, Fig. S5-S8). In that way, gummy bear shaped dosages printed with different infill density (80% vs 65%) were also difficult to identify at first glance, but instead they differed, as expected, in weight, manipulability and gumminess, which was greater in the denser figure (Supplementary data, Fig. S9 and Videos V5-V8).

Removing figures from the glass printing support without being broken was easy in all the cases, but faster in corn starch derived inks, as was expected because of the higher mechanical strength of this inks revealed in rheological tests. Overall, just a couple of minutes after printing process ended were needed to ensure the complete solidification of the ink throughout the figure. All the drugmies, once cold enough, could be trouble-free handled (Fig. 5).

3.4. Mass and content uniformity of drugmies

Individual weights of every 3D printed gummy dosage were used to calculate upper and lower limit mass values, according to the standard, for each model selected. All the weights fitted the limits and complied with the acceptance criteria, as none of the individual masses deviated from the average mass by more than 5% (Supplementary data, Tables S4-S7). Therefore, mass uniformity of drugmies was acquired regardless of 3D model selected or the formula used (Table 3).

In the same way, drug content and dose accuracy of drugmies printed with the two different ranitidine formulations —R(+)CS(+) and R(+)CS(-)— were determined (Table 4). Dose accuracy represented a successful outcome as values were higher than 90%. Content uniformity of the two batches of ranitidine drugmies widely complied with the standards since the measured content range were, in both cases, within the 85–115% marked by the general monograph. However, it is also necessary to indicate that although all the gummy dosages for this test were printed with same weight (800 mg approximately), theoretical API dose observed varied depending on the ink used. This was due to the fact that a greater amount of water was lost by evaporation during starch gelatinization process of R(+)CS(+) and the resulting formula had a slightly higher ranitidine hydrochloride concentration (Supplementary Data, Tables S12-S14), but uniform in its entirety.

3.5. Dissolution test and drug release profiles.

The dissolution studies are commonly used to simulate in vitro behaviour of the pharmaceutical dosages and to predict its bioavailability and effectiveness. As can be seen in the Fig. 6, although both formulations released practically 100% of their content after 120 min, the resulting dissolution profiles were entirely different. On the one hand, F4 (R(+)CS(-)) released fast the API and concentrations close to 100%

Table 2
Projected and measured sizes of the different 3D models.

3D Model	Projected size (mm)	Length (mm) \pm SD	Width (mm) \pm SD	Height (mm) \pm SD
Disk	15.0x15.0x4.5	15.01 \pm 0.01	15.00 \pm 0.00	4.27 \pm 0.07
Heart	19.6x16.5x3.0	19.59 \pm 0.04	16.45 \pm 0.06	2.94 \pm 0.07
Gummy Bear (80% infill)	20.8x11.2x7.8	20.56 \pm 0.06	10.97 \pm 0.05	7.44 \pm 0.08
Gummy Bear (65% infill)	20.8x11.2x7.8	20.44 \pm 0.08	10.98 \pm 0.04	7.42 \pm 0.08

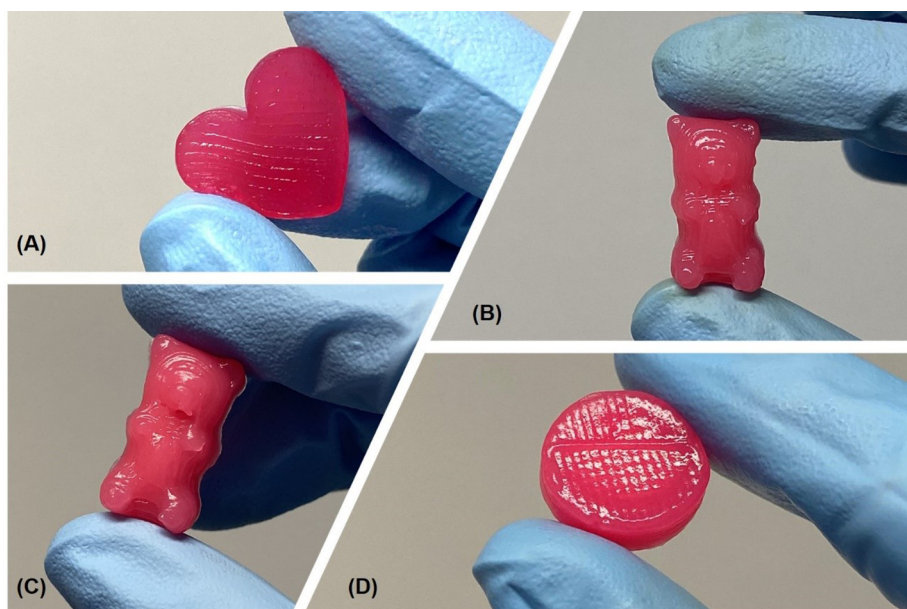


Fig. 5. Trouble-free handling of drugmies printed from different 3D models: (A) heart, (B) gummy bear with 80% infill density, (C) gummy bear with 65% infill density, (D) disk. Figures (B) and (C) have an identical appearance but differ in weight and mechanical strength.

after 15 min were obtained, giving place to a more immediate release-like profile. On the other hand, F2 (R(+))CS(+) showed a more extended-release of ranitidine, achieving only a 60% dissolved after 45 min. Although corn starch is usually employed in pharmaceutical tablet formulations due to the disintegrant properties (Adjei et al., 2017; Hartesi et al., 2016), the gelatinization step during the ink manufacturing process caused the opposite effect. In this case, gelatinized starch formed a more closely packed gel structure that act like a more resistant barrier to drug release, affecting the dissolution profile (Xu et al., 2014). Despite of the fact that F2 would not comply the USP specifications chosen for this work, this extended-release profile could be used as a new approach in designing oral ranitidine sustained forms.

4. Discussion

In this study, we explored the creation of ‘drugmies’, an alternative pharmaceutical form obtained through extrusion 3D printing that, besides containing a customized dose of active ingredient, had a better acceptance in some more demanding population sectors, such as children. Previous approaches to chewable dosages already demonstrated the importance of the figure design by using varied colours of cylindrical dosages (Goyanes et al., 2019) or either depositing semi-solid inks within a mould filled with a solidifying liquid matrix (Rycerz et al., 2019). In the present work, besides combining different models with greater complexity and more eye-catching form, the final aspect of the dosage has been greatly improved to make it as attractive as possible, not only by the colour, but also by the bright smooth finished surfaces, the gumminess, the manipulability and the touch when handling them.

The 3D printer used had the capability to successfully print different

designs introduced with all formulated inks, as it has a precise deposition control and a proper user-friendly operating software. Print head and print bed temperature regulation system enabled the management of inks thermo-responsive behaviour, reducing the viscosity by means of a higher temperature in the syringe and a rapid induced gelification in a cold fabrication platform for a solid-state recovery of the ink. The four suggested formulas resisted the extrusion process without flocculation, phase separation or irreversible rupture of the internal structure of the gel. DSC and XRD suggested that ranitidine hydrochloride exists in amorphous form within the ink matrix. Rheological tests also confirmed the suitability of the inks for the 3D printing technology used, as they showed shear thinning behaviour and a proper viscosity recovery. In this way, the inks that contained starch in its composition turned out to be the most appropriate, having a more rapid restructuring that provides a faster acquisition of the necessary mechanical strength to support the next extruded layer and also, to remove the figure from the printing bed when the printing process is finished. In this type of inks, in addition, the presence of ranitidine hydrochloride and its effect on the behaviour of the ink were cushioned. This finding opens the possibility of studying the use of this formula as a vehicle for the dosage of other active ingredients, which would facilitate the handling of the printer for the end user and would save time to the healthcare staff, because the more suitable printing parameters would be already specified and would not have to be investigated.

Drugmies had creative and eye-catching shapes, and a final appearance that did not differ from that of a conventional fruit gummy. The colour was homogeneous and bright, necessary aspects for a greater acceptance by the patient. On this issue, a non-uniform distribution of it could not only draw the attention from an aesthetic point

Table 3
Printed dosage weights and mass uniformity compliance limits.

Formula	Model	Mean weight (g) \pm SD	Weight compliance limits (g)
F1 - R(-)CS(+)	Disk	0.835 \pm 0.004	0.793 – 0.877
	Heart	0.615 \pm 0.011	0.584 – 0.646
	Gummy Bear (80% infill)	1.239 \pm 0.008	1.177 – 1.301
	Gummy Bear (65% infill)	1.131 \pm 0.005	1.075 – 1.188
F2 - R(+))CS(+)	Heart	0.774 \pm 0.007	0.735 – 0.812
F3 - R(-)CS(-)	Gummy Bear (80% infill)	1.288 \pm 0.004	1.223 – 1.352
F4 - R(+))CS(-)	Gummy Bear (65% infill)	1.126 \pm 0.007	1.070 – 1.182

Table 4
Drug content accuracy and individual content range of printed dosages.

Formula	Theoretical dose (mg) \pm SD	Measured dose (mg) \pm SD	Dose accuracy (%) \pm SD	Individual content compliance range (%)	Measured individual content range (%)
F2 - R(+)CS(+)	32.18 \pm 0.092	32.15 \pm 1.19	99.90 \pm 3.68	85.00 – 115.00	94.96 – 107.13
F4 - R(+)CS(-)	28.25 \pm 0.092	26.24 \pm 1.43	92.88 \pm 5.11	85.00 – 115.00	88.07 – 106.19

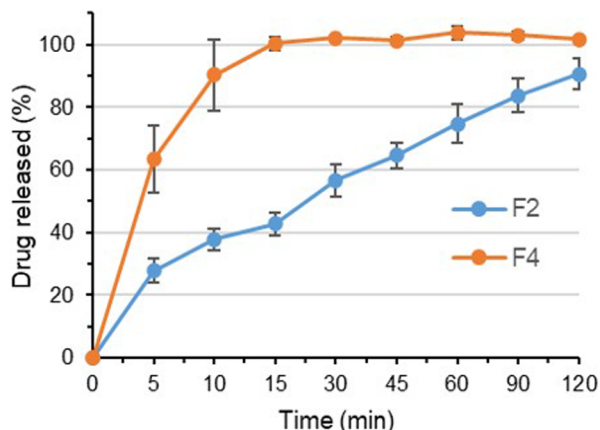


Fig. 6. Drug dissolution profiles of gummy dosages printed with F2 and F4 formulas.

of view, but also be associated with a lack of content uniformity, a low quality of the dosage or deterioration process. Likewise, no unpleasant odour that could cause rejection or could indicate a chemical alteration of any ink component, with the consequent effects on therapeutics that may appear, was detected.

All the gummy oral dosages reproduced the 3D models with very high fidelity and all the printed figures complied comfortably with the mass and content uniformity assays regardless of the 3D model selected, consolidating the reproducibility of the process for dosage unit fabrication and ensuring the obtention of the planned doses. Thus, adjusting ranitidine hydrochloride dose to the patient could be easily done, with safety and reliability, simply by choosing a 3D model and its size —a bigger size, a higher dose— or varying the filling density of the figure, since a reduction in the infill percentage lead to a decrease in figure final weight and therefore, a smaller amount of active ingredient.

Finally, dissolution studies revealed different drug release profiles of the inks derived from the starch content. A faster ranitidine release was obtained in starch-free formulas, while a slower and more extended release was achieved by adding corn starch among the components and allowing its gelification during the formulation process. Thereby, these results could be used to develop a new approach in 3D printed oral sustained forms.

5. Conclusions.

In this work, the use of additive manufacturing by syringe-based extrusion 3D printing for gummy oral dosages was investigated. This novel dosage form exhibited an attractive, funny, and appetising visual appearance in addition to acceptable structural features allowing easy handling and intake. In the context of process repeatability and work method validation for dosage unit fabrication, a preliminary assessment was conducted by applying basic manufacturing standards. Even though the production of this 3D printed oral gummy dosages was an experimental approach, just small weight variations were detected, fitting standards that only well-established tableting technology reproduce. Ability of drugmies to contain a given dose of API and dose uniformity evaluation also reported favourable results. In a clinical setting, this approach will empower healthcare staff with the capability

to provide specific dosing by changing the size, infill density or design of the printed figure, avoiding common errors derived from dosing liquid medication. Drugmies could enhance treatment adherence and help to decrease the emotional impact of the disease in children.

CRedit authorship contribution statement

Helena Herrada-Manchón: Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Project administration. **David Rodríguez-González:** Methodology, Investigation. **M. Alejandro Fernández:** Conceptualization, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Marc Suñé-Pou:** . **Pilar Pérez-Lozano:** Validation, Investigation, Resources, Resources. **Encarnación García-Montoya:** Validation, Investigation, Resources. **Enrique Aguilar:** Methodology, Resources, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We are grateful to the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Spain), AEI and FEDER (CTQ-2016-76794-P, PID2019-107580 GB-I00), and Science, Technology and Innovation Plan of Principado de Asturias and FEDER (Programa Asturias-IDI/2018/000060 and GRUPIN-IDI/2018/000231) for financial support.

The authors would like to acknowledge the technical support received by Dr. Ana Belén García-Delgado with Agilent Cary 60 UV-Vis spectrophotometer, Dr. Olvido Iglesias and Prof. Carlos González-Sánchez in rheological tests, and by Servicios Científico-Técnicos of Universidad de Oviedo (in XRD and DSC).

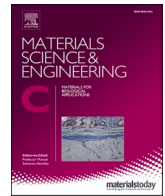
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119687>.

References

- Adjei, F.K., Osei, Y.A., Kuntworbe, N., Ofori-Kwakye, K., 2017. Evaluation of the Disintegrant Properties of Native Starches of Five New Cassava Varieties in Paracetamol Tablet Formulations. *J. Pharm.* 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/2326912>.
- Ameen, V.Z., Pobiner, B.F., Giguere, G.C., Carter, E.G., 2006. Ranitidine (Zantac®) syrup versus ranitidine effervescent tablets (Zantac® EFFERdose®) in children: A single-center taste preference study. *Pediatr. Drugs* 8, 265–270. <https://doi.org/10.2165/00148581-200608040-00005>.
- Awad, A., Trenfield, S.J., Gaisford, S., Basit, A.W., 2018. 3D printed medicines: A new branch of digital healthcare. *Int. J. Pharm.* 548, 586–596. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.024>.
- Azam, S.M.R., Zhang, M., Mujumdar, A.S., Yang, C., 2018. Study on 3D printing of orange concentrate and material characteristics. *J. Food Process Eng.* 41, 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12689>.
- Barbara Akpanud, V.S., 2014. “Doc, I Just Can’t Swallow Pills”: HIV Infected Patients and Pill Phagophobia. *J. AIDS Clin. Res.* 05. <https://doi.org/10.4172/2155-6113.1000348>.

- Beck, M.H., Cataldo, M., Slifer, K.J., Pulbrook, V., Guhman, J.K., 2005. Teaching Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and Autistic Disorder (AD) How to Swallow Pills. *Clin. Pediatr. (Phila)* 44, 515–526. <https://doi.org/10.1177/000992280504400608>.
- Brenner, T., Tuvikene, R., Fang, Y., Matsukawa, S., Nishinari, K., 2015. Rheology of highly elastic iota-carrageenan/kappa-carrageenan/xanthan/konjac glucomannan gels. *Food Hydrocoll.* 44, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.016>.
- Chieng, N., Aaltonen, J., Saville, D., Rades, T., 2009. Physical characterization and stability of amorphous indomethacin and ranitidine hydrochloride binary systems prepared by mechanical activation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.06.022>.
- Chieng, N., Zujovic, Z., Bowmaker, G., Rades, T., Saville, D., 2006. Effect of milling conditions on the solid-state conversion of ranitidine hydrochloride form 1. *Int. J. Pharm.* 327, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.032>.
- Crawford, C., Anderson, M., Cooper, G., Jackson, G., Thompson, J., Vale, A., Thomas, S.H.L., Eddleston, M., Bateman, D.N., 2018. Overdose in young children treated with anti-reflux medications: Poisons enquiry evidence of excess 10-fold dosing errors with ranitidine. *Hum. Exp. Toxicol.* 37, 343–349. <https://doi.org/10.1177/0960327117705430>.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), 2013a. 2.9.5. Uniformity of Mass of Single-Dose Preparations, in: *European Pharmacopoeia*. 8.0. pp. 297–298.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), 2013b. 2.9.6. Uniformity of Content of Single-Dose Preparations, in: *European Pharmacopoeia*. 8.0. pp. 298–299.
- Fields, J., Go, J.T., Schulze, K.S., 2015. Pill Properties that Cause Dysphagia and Treatment Failure. *Curr. Ther. Res. - Clin. Exp.* 77, 79–82. <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2015.08.002>.
- Gardiner, P., Dvorkin, L., 2006. Promoting medication adherence in children. *Am. Fam. Physician*, pp. 74.
- Goyanes, A., Kobayashi, M., Martínez-Pacheco, R., Gaisford, S., Basit, A.W., 2016. Fused-filament 3D printing of drug products: Microstructure analysis and drug release characteristics of PVA-based caplets. *Int. J. Pharm.* 514, 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.021>.
- Goyanes, A., Madla, C.M., Umerji, A., Duran Piñeiro, G., Giraldez Montero, J.M., Lamas Diaz, M.J., Gonzalez Barcia, M., Taherali, F., Sánchez-Pintos, P., Couce, M.L., Gaisford, S., Basit, A.W., 2019. Automated therapy preparation of isoleucine formulations using 3D printing for the treatment of MSUD: First single-centre, prospective, crossover study in patients. *Int. J. Pharm.* 567, 118497. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118497>.
- Goyanes, A., Robles Martinez, P., Buanz, A., Basit, A.W., Gaisford, S., 2015a. Effect of geometry on drug release from 3D printed tablets. *Int. J. Pharm.* 494, 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.04.069>.
- Goyanes, A., Wang, J., Buanz, A., Martínez-Pacheco, R., Telford, R., Gaisford, S., Basit, A.W., 2015b. 3D Printing of Medicines: Engineering Novel Oral Devices with Unique Design and Drug Release Characteristics. *Mol. Pharm.* 12, 4077–4084. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00510>.
- Guo, C.F., Zhang, M., Bhandari, B., 2019. A comparative study between syringe-based and screw-based 3D food printers by computational simulation. *Comput. Electron. Agric.* 162, 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.04.032>.
- B. Hartesi A. Sriwidodo M., Chaerunisaa, A.Y., Starch as pharmaceutical excipient *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 41 2016 59 64.
- Huang, C.Y., 2018. Extrusion-based 3D Printing and Characterization of Edible Materials. University of Waterloo. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.10.028>.
- Kajjari, P.B., Manjeshwar, L.S., Aminabhavi, T.M., 2011. Semi-Interpenetrating Polymer Network Hydrogel Blend Microspheres of Gelatin and Hydroxyethyl Cellulose for Controlled Release of Theophylline. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 7833–7840. <https://doi.org/10.1021/ie200516k>.
- Khaled, S.A., Burley, J.C., Alexander, M.R., Yang, J., Roberts, C.J., 2015a. 3D printing of tablets containing multiple drugs with defined release profiles. *Int. J. Pharm.* 494, 643–650. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.067>.
- Khaled, S.A., Burley, J.C., Alexander, M.R., Yang, J., Roberts, C.J., 2015b. 3D printing of five-in-one dose combination polypill with defined immediate and sustained release profiles. *J. Control. Release* 217, 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.028>.
- Lajoie, A., Janiaud, P., Henin, E., Gleize, J.C., Berlion, C., Nguyen, K.A., Nony, P., Gueyffier, F., Maucourt-Boulch, D., Kassai Koupaï, B., 2017. Assessing the effects of solid versus liquid dosage forms of oral medications on adherence and acceptability in children. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012783>.
- Li, H., Liu, S., Lin, L., 2016. Rheological study on 3D printability of alginate hydrogel and effect of graphene oxide. *Int. J. Bioprinting* 2, 10–12. <https://doi.org/10.18063/IJB.2016.02.007>.
- Liu, X., Wang, Y., Yu, L., Tong, Z., Chen, L., Liu, H., Li, X., 2013. Thermal degradation and stability of starch under different processing conditions. *Starch/Staerke* 65, 48–60. <https://doi.org/10.1002/star.201200198>.
- Liu, Y., Yu, Y., Liu, C., Regenstein, J.M., Liu, X., Zhou, P., 2019a. Rheological and mechanical behavior of milk protein composite gel for extrusion-based 3D food printing. *Lwt* 102, 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.053>.
- Liu, Z., Bhandari, B., Prakash, S., Mantihal, S., Zhang, M., 2019b. Linking rheology and printability of a multicomponent gel system of carrageenan-xanthan-starch in extrusion based additive manufacturing. *Food Hydrocoll.* 87, 413–424. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.026>.
- Liu, Z., Zhang, M., Bhandari, B., 2018. Effect of gums on the rheological, microstructural and extrusion printing characteristics of mashed potatoes. *Int. J. Biol. Macromol.* 117, 1179–1187. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.048>.
- Madathilethu, J., Roberts, M., Peak, M., Blair, J., Prescott, R., Ford, J.L., 2018. Content uniformity of quartered hydrocortisone tablets in comparison with mini-tablets for paediatric dosing. *BMJ Paediatr. Open* 2, 1–7. <https://doi.org/10.1136/bmjpo-2017-000198>.
- Mirmehrabi, M., Rohani, S., Murthy, K.S.K., Radatus, B., 2004. Solubility, dissolution rate and phase transition studies of ranitidine hydrochloride tautomeric forms. *Int. J. Pharm.* 282, 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.031>.
- A.C. Moffat M.D. Osselton B. Widdop Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material Fourth ed. ed. 2011 Pharmaceutical Press London 10.1007/978-94-009-8066-2.9.
- G. Nahler Dictionary of Pharmaceutical Medicine Fourth. ed 2017 Springer International Publishing, Cham Dictionary of Pharmaceutical Medicine 10.1007/978-3-319-50669-2.
- Norman, J., Madurawe, R.D., Moore, C.M.V., Khan, M.A., Khairuzzaman, A., 2017. A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 108, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.001>.
- Okwuosa, T.C., Pereira, B.C., Arafat, B., Cieszyńska, M., Isreb, A., Alhnan, M.A., 2017. Fabricating a Shell-Core Delayed Release Tablet Using Dual FDM 3D Printing for Patient-Centred Therapy. *Pharm. Res.* 34, 427–437. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2073-3>.
- S.R. Orenstein J.L. Blumer H.M. Faessel J.A. McGuire K. Fung B.U.K. Li J.E. Lavine J.E. Grunow W.R. Treem A.A. Ciociola Ranitidine, 75 mg, over-the-counter dose: Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects in children with symptoms of gastro-oesophageal reflux 2002 *Pharmacol. Ther. Aliment* 10.1046/j.1365-2036.2002.01243.x.
- Palekar, S., Nukala, P.K., Mishra, S.M., Kipping, T., Patel, K., 2019. Application of 3D printing technology and quality by design approach for development of age-appropriate pediatric formulation of baclofen. *Int. J. Pharm.* 556, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.062>.
- Ramachandran, S., Thirumurugan, G., Dhanaraju, M.D., 2011. Development and evaluation of biodegradable chitosan microspheres loaded with ranitidine and cross linked with glutaraldehyde. *Am. J. Drug Discov. Dev.* 1, 105–120. <https://doi.org/10.3923/ajdd.2011.105.120>.
- Rycerz, K., Stepien, K.A., Czapińska, M., Arafat, B.T., Habashy, R., Isreb, A., Peak, M., Alhnan, M.A., 2019. Embedded 3D Printing of Novel Bespoke Soft Dosage Form Concept for Pediatrics. *Pharmaceutics* 11, 630. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11120630>.
- Ryu, G.S., Lee, Y.J., 2012. Analysis of liquid medication dose errors made by patients and caregivers using alternative measuring devices. *J. Manag. Care Pharm* <https://doi.org/10.18553/jmcp.2012.18.6.439>.
- Sadia, M., Arafat, B., Ahmed, W., Forbes, R.T., Alhnan, M.A., 2018. Channelled tablets: An innovative approach to accelerating drug release from 3D printed tablets. *J. Control. Release* 269, 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.022>.
- Saha, D., Bhattacharya, S., 2010. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. *J. Food Sci. Technol.* 47, 587–597. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0162-6>.
- Sandritter, T., 2003. Gastroesophageal reflux disease in infants and children. *J. Pediatr. Heal. Care* 17, 198–205. <https://doi.org/10.1067/mp.2003.59>.
- Schork, N.J., 2015. Personalized medicine: Time for one-person trials. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/520609a>.
- Skowrya, J., Pietrzak, K., Alhnan, M.A., 2015. Fabrication of extended-release patient-tailored prednisolone tablets via fused deposition modelling (FDM) 3D printing. *Eur. J. Pharm. Sci.* 68, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.11.009>.
- Trenfield, S.J., Awad, A., Goyanes, A., Gaisford, S., Basit, A.W., 2018. 3D Printing Pharmaceuticals: Drug Development to Frontline Care. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 440–451. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.02.006>.
- Volovitz, B., Dueñas-Meza, E., Chmielewska-Szewczyk, D.A., Kosa, L., Astafieva, N.G., Villaran, C., Pinacho-Daza, C., Laurenzi, M., Jasan, J., Menten, J., Leff, J.A., 2000. Comparison of oral montelukast and inhaled cromolyn with respect to preference, satisfaction, and adherence: A multicenter, randomized, open-label, crossover study in children with mild to moderate persistent asthma. *Curr. Ther. Res. - Clin. Exp.* 61, 490–506. [https://doi.org/10.1016/S0011-393X\(00\)80032-6](https://doi.org/10.1016/S0011-393X(00)80032-6).
- Xu, H., Shi, M., Liu, Y., Jiang, J., Ma, T., 2014. A Novel In Situ Gel Formulation of Ranitidine for Oral Sustained Delivery. *Biomol. Ther. (Seoul)* 22, 161–165. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2013.109>.
- Yang, F., Zhang, M., Bhandari, B., Liu, Y., 2018. Investigation on lemon juice gel as food material for 3D printing and optimization of printing parameters. *LWT - Food Sci. Technol.* 87, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.054>.



Three-dimensional bioprinted cancer models: A powerful platform for investigating tunneling nanotube-like cell structures in complex microenvironments

Helena Herrada-Manchón^{a,b,1}, Lucía Celada^{c,d,1}, David Rodríguez-González^{a,b},
M. Alejandro Fernández^{b,*}, Enrique Aguilar^a, María-Dolores Chiara^{c,d,e,**}

^a Centro de Innovación en Química Avanzada (ORFEO-CINQA), Instituto Universitario de Química Organometálica "Enrique Moles", Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Universidad de Oviedo, 33006, Spain

^b Fundación Idonial, Parque Científico y Tecnológico de Gijón, 33203 Gijón, Spain

^c Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, 33011 Oviedo, Spain

^d CIBERONC, 28029 Madrid, Spain

^e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

3D bioprinting
cancer models
Cell-to-cell communication
Tunneling nanotubes

ABSTRACT

Bioprinting technology offers layer-by-layer positioning of cells within 3D space with complexity and a defined architecture. Cancer models based in this biofabrication technique are important tools to achieve representative and realistic in vivo conditions of the tumor microenvironment. Here, we show the development of a proof-of-concept three-dimensional bioprinted cancer model that successfully recapitulates the intercellular communication via the assembly of functional tunneling nanotube (TNT)-like cell projections. Different combinations of collagen-containing culture medium, sodium alginate and gelatin were initially prepared and rheologically evaluated. The optimized mixture was used to print two preliminary 3D models for cancer cell seeding. Favourable results in cell viability and proliferation led to the inclusion of 786-O renal cancer cells into the biomaterial mixture to directly bioprint the most suitable 3D model with embedded cells. Bioprinted cells remained viable for at least 15 days of culture and proliferated. More importantly, these cancer cells were able to build TNT-like cellular projections inside the hydrogel that established direct contacts between distant cells. We show that these structures were used as channels for the scrolling and intercellular transfer of mitochondria thus reproducing TNT's function in 2D culture systems. This 3D bioprinted renal cancer model provides a novel alternative tool for studying the functional relevance of TNT-like structures in tumorigenesis and anticancer drug susceptibility in a highly controlled and reproducible tumor microenvironment.

1. Introduction

Cell culture is an extensively used tool for the in vitro study of cell biology, tissue morphology, or disease mechanisms. Specifically, two-dimensional (2D) cell culture models have played an important role in enhancing our understanding of cancer development and progression. However, it is well-recognized that those systems fail to accurately represent the tumor ecosystems or recapitulate in a precise manner the cellular interactions that take place in the complex cancer tissues [1,2].

Cells growing in monolayers have an unlimited access to the medium

ingredients (oxygen, metabolites, growth factors...), which becomes inconvenient when trying to mimic real cancer tissues where nutrient availability is highly heterogeneous due to the intrinsic complexity of the tumor tissue architecture [2–4]. Furthermore, the bidirectional flow of information between the cellular and extracellular components of the tumor ecosystem cannot be recapitulated in the non-physiological 2D cell culture models [5,6]. On another hand, there are cell processes observed in 2D culture models that do not have a correlate in vivo [7]. This is particularly relevant in the case of the novel and revolutionary field of cell-to-cell communication through the tunneling nanotube

* Corresponding author.

** Correspondence to: M.-D. Chiara, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Av de Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain.

E-mail address: mdchiara.uo@uniovi.es (M.-D. Chiara).

¹ Equal contribution.

(TNT)-like projections. TNTs are thin membrane tubes that connect distant cells and function as channels for the intercellular transport of diverse cargo including cellular organelles such as mitochondria [8]. TNTs were initially identified in 2D cancer cell culture models what raised the question whether their formation could be a consequence of the artificial conditions of the cell culture [9]. TNTs' heterogeneity, lability and poor structural characterization is still hampering unequivocal demonstration of their presence in complex cancer tissues or even 3D culture conditions thus raising skepticism in the scientific community about their existence and their putative pathological role in cancer [10].

The analysis of TNTs in living animals would provide a wealth of information about cancer cell behaviour in a physiopathologically relevant context. However, in vivo models are too complex to study TNT-mediated specific interactions between cells [1,2]. Consequently, 3D cell cultures are a working alternative and, particularly, 3D bioprinting is showing promise for the development of in vitro models in a different approach [11–13].

Bioprinting technology offers layer-by-layer positioning of cells within 3D space, with the shape and architecture defined using computer-aided design (CAD) [14,15]. Broadly categorized as either extrusion, droplet, or laser-based bioprinting, provides an automatized, precise and repeatable method particularly useful to mimic tumor microenvironment [16–19]. The use of 3D bioprinted tumors is increasing in areas like tumor biology, migration, invasion, and metastasis, as well as in high-throughput drug screening and validation, even providing the possibility for personalized medicine [20–23].

It is important to highlight that replicating 3D cell-systems is extremely challenging and cannot be achieved without a strong work in bioink formulation and rheological analysis. The combination of biomaterials, cells and other key factors to form a printable hydrogel, plays a fundamental role in subsequently obtaining a structure with high shape fidelity, in addition to enough cell viability [15,24].

In this work, syringe-based extrusion bioprinting encompassed, firstly, the fabrication of preliminary 3D-matrices to test viability, adhesion and cell growth. After this first approach, and the selection of the most suitable 3D model, a cell-loaded formulation was directly deposited generating multilayer grid structures to represent tumor models for studying cancer cell behaviour. We show here that this single-cell model is useful as proof-of-concept model that confirm not only the possibility of bioprinting cancer cells, but also the observation of direct cell-to-cell communication and mitochondria trafficking via TNT-like protrusions which, to the best of our knowledge, has not been described before in this setting and for a renal cancer cell line. The discovery of TNT-like structures (and associated mitochondria-transfer) in a bioprinted cancer cell model support the notion that TNT assembly is not associated with culture conditions in 2D settings. Moreover, this system offers a unique opportunity for deeper studies of these communications in controlled and reproducible 3D models to disentangle utmost importance aspects of cancer, such as drug resistance acquisition and other metabolic and molecular processes involved in cancer progression [25,26].

2. Materials and methods

2.1. Materials

Gelatin, from porcine skin (CAS no. 9000-70-8), sodium alginate (CAS no. 9005-38-3) and calcium chloride (CAS no. 10035-04-8) were purchased from Sigma-Aldrich Química S.L., Madrid. Other materials were: collagen type I high concentration from rat tail (Corning), Minimum Essential Medium Eagle 10× (Sigma-Aldrich), Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco), sodium bicarbonate 7.5% (Thermo Fisher), and Phosphate Saline buffer (PBS) (Corning).

2.2. Biomaterial ink preparation

The intrinsic characteristics of the selected materials prevented a one-pot mixing of the components, as gelatin needs heating for melting and collagen coagulates easily above 37 °C. In that way, we proceeded to prepare the bioinks by mixing a collagen-containing culture medium (called part A) with a biomaterial hydrogel made with sodium alginate, type A gelatin and PBS as solvent (part B) (Table 1). Three different volumetric ratios were tested to select the most suitable for bioprinting the models. Part A ingredients were used as purchased, measured and directly mixed in a 3 mL Eppendorf. In the exploratory study of the biomaterial inks (performed without cells), simple DMEM was added replacing the cell suspension corresponding volume to have a rheological behaviour and printing results as close as possible to the final cell-loaded inks. Part B formulation was elaborated as follows. Firstly, gelatin was weighted, hydrated with half of PBS quantity, and heated in a 40 ± 2 °C bath. Meanwhile, required amount of sodium alginate was mixed under stirring in the remaining volume of PBS. Once gelatin was totally melted, it was slowly added to the alginate blending and gently mixed until complete incorporation. Then, it was left to rest in a bath during 24 h, wrapped with food grade plastic protective film to let the air bubbles disappear. To prepare the mixtures, corresponding volumes of part A and part B were transferred to printer-compatible syringes (BD 3 mL syringe Luer-Lock™Tip; Benton, Dickinson and Company, Belgium). Both syringes were joined with a female-female luer lock transfer connector (Aesthetic Group, France) and the contents of each cartridge were gently combined until the ink was homogeneous (Supplementary data, Fig. S1). Empty syringe and connector were removed, and plastic caps were screwed in nozzle openings to prevent ink loss. Syringes rested in a 30 ± 2 °C bath until use.

2.3. Rheological characterization of the mixtures

Rheological analysis was carried out with a controlled stress rheometer (Discovery HR-2, DHR, TA instruments, USA) equipped with a parallel plate (25 mm diameter, 0.5 mm gap) and a controlled convection/radiant heating oven for stable temperature control (Environmental Test Chamber, ETC, TA Instruments, USA). Inks were maintained in a 25 °C bath until testing and were loaded using a plastic spatula. Conditioning steps (30 s) were added prior to every assay to ensure correct sample temperature. Shear-viscosity tests were conducted in flow ramp mode with an increasing shear rate (from 0.01 to 100 s⁻¹) within 120 s at 25 °C. Thixotropy at same temperature was measured through a shear recovery test with 3 different steps: 120 s at low shear rate (0.4 s⁻¹), 40 s at high shear rate (100 s⁻¹) and finally, 120 s at low shear rate (0.4 s⁻¹). Structural recovery of the inks was determined as the percentage of viscosity obtained during the first 40 s and the 120 s in the third step, based on the equilibrium viscosity (the average viscosity obtained in the last 40 s of the first step). Small-amplitude oscillatory shear (SAOS) tests were used to study the viscoelastic behaviour of the inks. First, linear viscoelastic interval (LVR) was determined with amplitude sweeps in a 0.1 to 1000% strain interval at 1 Hz. Frequency sweeps were performed from 0.1 to 10 rad/s at a constant deformation of 1% (value within the LVR region). Curves were plotted with average

Table 1
Detailed compositions and mixtures.

Part A	Collagen	23% (v/v)	
	MEM (×10)	10% (v/v)	
	NaHCO ₃	7% (v/v)	
	Cell suspension/DMEM	60% (v/v)	
Part B	Sodium alginate	6% (w/w)	
	Gelatin	16% (w/w)	
Mixtures tested	3:1	1:1	1:3
Part A	3	1	1
Part B	1	1	3

data of three replicates of every assay. Results were recorded and processed by TRIOS software (version 4.5.0, TRIOS Rheology Software, TA Instruments, USA).

2.4. Gcode generation and 3D printing setup

A syringe-based extrusion 3D printer (bIDO-I, Idonial Technological Center, Spain) was used to print the constructs. A flat disk 3D model (15 mm diameter, 0.5 mm height) was imported into an open-source slicing software (Slic3r), from which different versions of G-code were exported depending on the printing parameters set. To select a suitable printing speed, simple squares were printed by triplicate at three different speeds (5 mm/s, 10 mm/s and 15 mm/s). Uniformity and thickness of the printed struts were measured to assess the most appropriate. Other fixed main printing parameters were: 0.15 mm layer height, 60% infill density, 90° infill angle and single perimeters. An extended list of printing parameters is included in Supplementary data. Simple skirt printing was set to establish continuous ink flow before printing. Extruder temperature and printing bed temperature were maintained in 25 °C and 14 °C, respectively, to achieve a correct ink flow without exceeding thermal stress to the cells. Stainless steel, blunt end dispenser tips (Fisnar, United Kingdom) with 0.25 mm inner diameter (25G) were used as printer nozzles. 35 mm sterilized dishes (μ -Dish 35 mm, low wall, ibiTreat; ibidi GmbH, Germany) were chosen as printing supports, since they allowed easy handling, direct microscopic analysis, ensure sterility and hinder evaporation when totally closing the lid.

2.5. 3D printing of preliminary models and cell seeding

For preliminary cell seeding into the selected biomaterial ink, two 3D model configurations were tested. First model printed was a common scaffold, with same porosity in every layer (Fig. 1A). Second model, instead, had a bottom solid layer (100% infill density) followed by common porous scaffold layers (Fig. 1B). Setting these two models was useful to determine whether the cells adhere to the solid hydrogel layer and/or to the plate surface. Detailed images of the 3D structures' Slic3r preview can be seen at Supplementary data (Fig. S2).

Once printed, constructs were soaked with a 0.5% (w/v) CaCl₂ solution for 2 min to allow alginate crosslinking. After that, CaCl₂ solution was removed and scaffolds were gently washed with PBS to remove possible excess of salts. Then, 5×10^4 SCC38 cells or 2.5×10^4 786-O cells were seeded on the top of the scaffolds and incubated under regular cell culture conditions for 72 h.

2.6. Bioink preparation and 3D printing process

Part A, containing 2×10^6 cells, was immediately transferred into a 3 mL syringe and subsequently mixed with 1.5 mL of the previously prepared part B hydrogel until homogenization. Cell-laden bioinks were kept in a 30 ± 2 °C bath until printing. Bottom solid layer scaffold (Fig. 1B) was selected as 3D model for allowing a better observation of the cells along the different layers. After printed, scaffolds were cross-linked with 0.5% (w/v) CaCl₂ solution for 2 min and then washed with PBS. Finally, DMEM containing 10% of fetal bovine calf serum, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL) was added as culture media.

2.7. Cell culture and transfection

The clear cell renal cell carcinoma (786-O) and larynx-squamous cell carcinoma (SCC38) cell lines were grown in 10 cm diameter plates in a humidified incubator (37 °C, 5% CO₂) with DMEM containing 10% of fetal bovine calf serum, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL). The SCC38 cell line was kindly provided by Dr. R. Grenman and the 786-O cell line was a generous gift from Dr. M. Calzada. Cell lines were periodically tested for human pathogens and mycoplasma infection. All methods were carried out in accordance with the approved guidelines of our institution.

For lentiviral infection, 293 T cells were transiently co-transfected with lentiviral packaging mix and GFP-pGIPZ (Dharmacon) plasmid using Lipofectamine 3000 reagent. The virus-containing media was collected 48 h post-transfection and immediately used to infect 786-O cells in the presence of 8 μ g/mL of polybrene. The infection procedure was repeated 24 h later. Selection of GFP-expressing cells was performed with 6 μ g/mL of puromycin for 10 days. Stable pooled populations of cells were maintained in culture using 2 μ g/mL of puromycin.

2.8. Cell viability

Cell viability was analysed with the Live/Dead viability/cytotoxicity kit (Thermo Fisher) following manufacturer's instructions. Briefly, cells were incubated with 2 μ M calcein AM and 4 μ M ethidium homodimer-1 in PBS for 30 min at 25 °C before microscope visualization using fluorescein and rhodamine optical filters to visualize calcein- (live cells) and ethidium homodimer-1- (dead cells) stained cells.

2.9. Fluorescent cell labelling and immunofluorescence

For in vitro mitochondria labelling, cells were incubated with

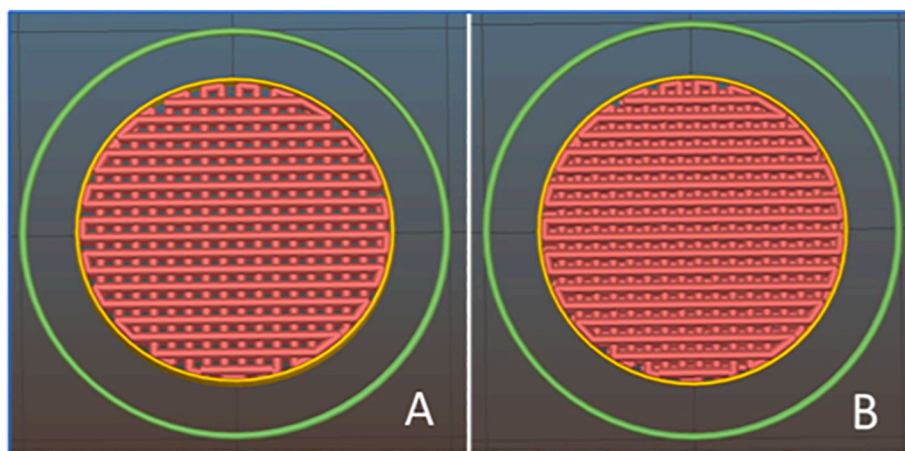


Fig. 1. Slic3r software preview of 3D models. (A) Regular scaffold: traditional meshes with struts deposited forming an angle of 90 degrees with the next layer; (B) Scaffold with bottom solid layer: structures where the first layer of the scaffold is printed with 100% infill density, followed by a 90-degree mesh printed.

MitoTracker® Red CMXRos (Thermo Fisher) for 30 min and then extensively washed with cell culture media following manufacturer's instructions. For immunofluorescence, mouse anti- β -actin and mouse anti- α -tubulin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were used at 1:500 dilution; rabbit anti-LAMP-1 (Abcam, Cambridge, UK) and rabbit anti-LC3B (Novus Biologicals, Colorado, USA) were used at 1:100 dilution. Anti-rabbit or anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 and anti-mouse IgG Alexa Fluor 555 were used as secondary antibodies at 1:500 dilutions. Mounting medium containing DAPI was added to visualize nucleus. Immunofluorescence stainings were analysed on a Zeiss AxioObserver Z1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with a Plan-Apochromat 40 \times /1.3 (NA = 1.3, working distance = 0.21 mm) or Plan-Apochromat 63 \times /1.4 (NA = 1.4, working distance = 0.19 mm) oil lens objective, a camera (AxioCam MRm; Carl Zeiss), and Apotome (ApoTome 2; Carl Zeiss) as previously described 26.

2.10. TnT-like structures quantification

Quantifications of TnT-like structures were achieved by using bright field or fluorescence microscopy in life-cells or fixed-cells. For estimations of TnT percentages, cells were pictured using 8 \times 8 tiles.

3. Results

3.1. Rheological characterization and selection of biomaterial ink

Different rheological tests were carried out for a first printability assessment of the inks and to determine the more suitable mixture A:B for bioprinting the models. Flow curves (Fig. 2A) showed a greater shear-thinning behaviour when higher content of part B hydrogel was present in the composition. By contrast, 3:1 mixture had a practically Newtonian behaviour, represented by straight lines for both stress (σ) and viscosity (η) whose remained constant independently of the shear rate ($\dot{\gamma}$) value.

Regarding the shear recovery tests, neither of the mixtures quickly recovered the gel internal structure after a high shear rate (100 s⁻¹) at 25 °C (Fig. 2B). Similar percentages were found for 1:1 and 1:3 formulas:

around 35% and 50% of viscosity recovery, for 40 s and 120 s after the high shear rate step, respectively (Fig. 2C). Percentages were even lower for 3:1 ink. These results revealed that, once extruded, the fluids take a long time to recover and that some external help was needed to assist shape retention and preventing them from spilling onto the surface due to gravity. In this vein, taking advantage of the fact that gelatin generates thermo-reversible hydrogels, this weak point was overcome by applying a low temperature in the printing bed and inducing an in-situ instant gelation of the ink.

In SAOS test, LVR was first determined through amplitude sweeps to ensure that tests were carried out without destroying internal structure of the inks (Supplementary data, Fig. S3). Constant deformation of 1% was set for frequency sweeps, which display the viscoelastic response of the mixtures (Fig. 2D). Every mixture exhibited a typical weak-gel behaviour since storage modulus (G') values were higher than loss modulus (G'') values in the three formulations. In addition, higher G' values (related with better self-supporting ability and larger mechanical strength of the gel) were found for 1:1 mixture. Following all the results, the volumetric ratio selected for bioprinting the 3D models was 1:1 due to the more favourable viscoelastic properties and the shear-thinning behaviour.

3.2. 3D printing process

To set the most suitable printing speed, a simple printing test was carried out with the selected ink at different velocities. A speed of 10 mm/s was established for the greater definition in the lines with less deviation (Fig. 3A). The photo image and stereomicroscopic micrograph showed regular pores and struts in the printed scaffolds (Fig. 3B-C). Both model configurations (scaffold with/without bottom solid layer) showed repeatable results.

3.3. Viability and proliferation of cancer cells seeded in printed scaffolds

To determine whether cancer cells are viable and retain their ability to proliferate in the presence of biomaterial inks, two different types of scaffolds were used: (i) regular scaffolds printed on culture plates with

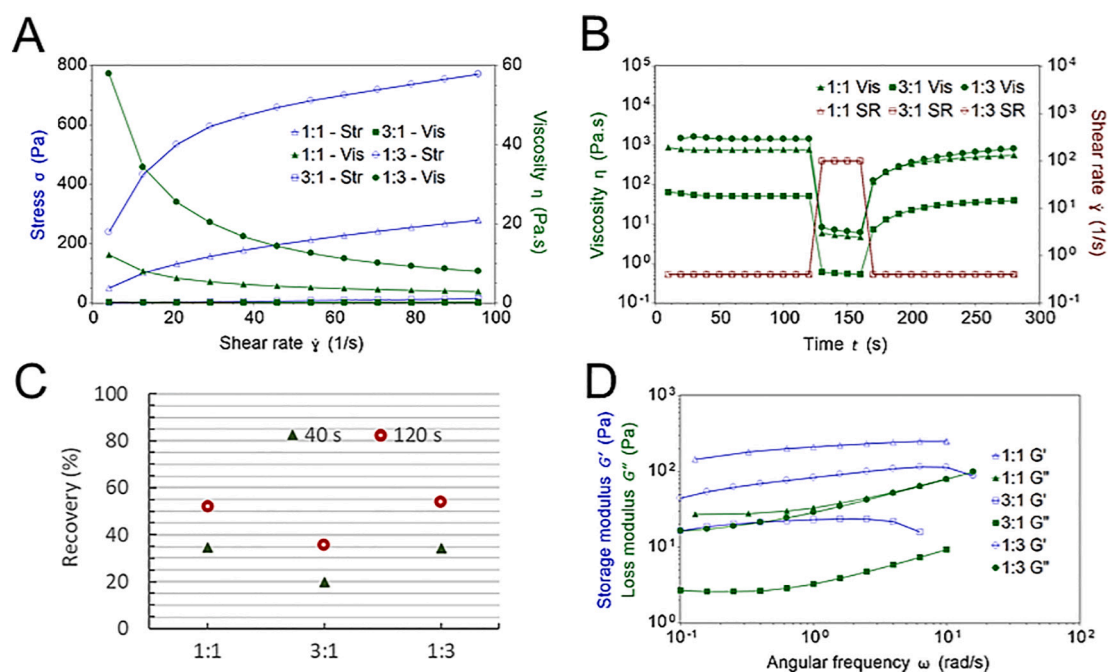


Fig. 2. Rheological tests. (A) Shear stress and viscosity profiles from 0.01 to 100 s⁻¹ within 120 s at 25 °C. (B) Shear-recovery test for inks thixotropy evaluation and (C) percentage of viscosity recovery 40 s and 120 s after a high shear rate. (D) Frequency sweeps showing storage modulus (G') and loss modulus (G'') of the inks at 25 °C.

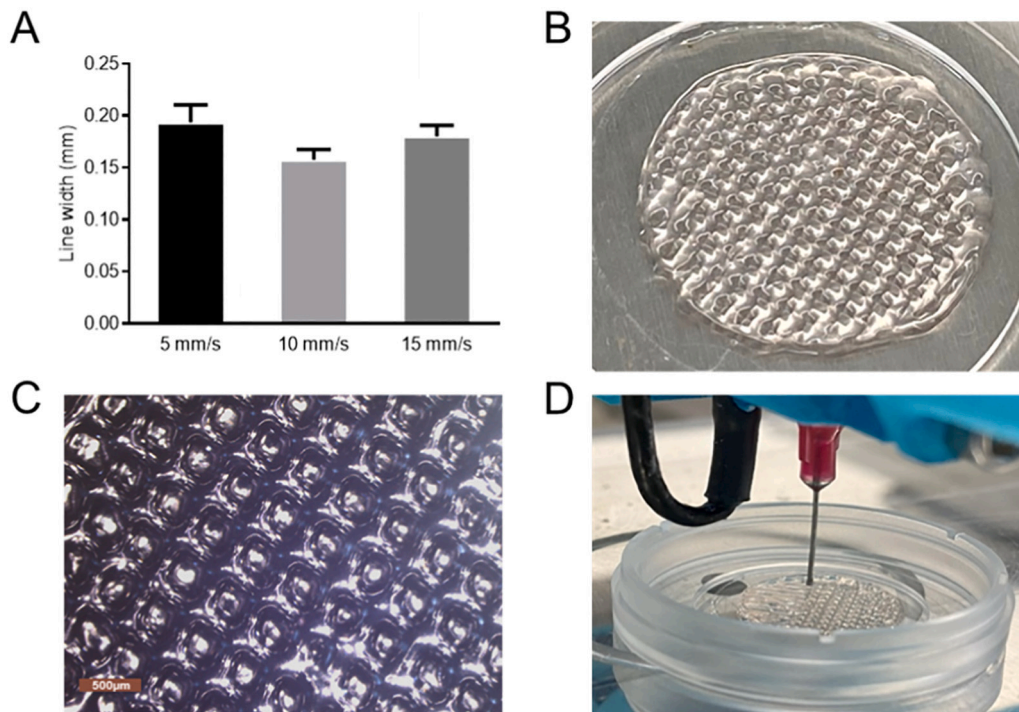


Fig. 3. Scaffold 3D printing. (A) Histogram showing line width measurement of bioprinted scaffold printed at 5, 10 and 15 mm/s. Photographs taken with camera (B) and stereomicroscope (C) showed regular pore size and line width. Scale bar: 500 μm . (D) Printing process detail.

glass bottoms and (ii) scaffolds printed with a bottom hydrogel solid layer. Two types of cancer cells, 786-O and SCC38, derived from renal cancer or squamous cell carcinoma, respectively, were seeded on the top of the scaffolds and subsequently incubated under regular cell culture conditions for 72 h. As shown in Fig. 4A, both types of cells adhered to the plate coverslips establishing contacts with the hydrogel-boundaries when seeded in regular scaffolds and showing that there is certain cellular tropism towards the hydrogel. Adhered cells spread, i.e., became flattened on the 2D glass substrate indicating that they maintained active polymerization of actin filaments which is the driving force that pushes the membrane forward and allows the motility processes of cancer cells. Moreover, cells proliferated and occupied the whole glass surface after 48 h of culture.

Different cell behaviour was found when cells were cultured on scaffolds with bottom solid layer. As reported for other types of hydrogels, cells did not grow as monolayer but self-assembled forming 3D multicellular spheroids (MCS) (Fig. 4). SCC38 cells formed larger MCS (mean diameter: 70–90 μm) than 786-O cells (mean diameter: 20–35 μm) after 24 h of incubation. In addition, whereas SCC38 cells formed regularly shaped MCS, those assembled with 786-O cells were more amorphous showing less cohesiveness between cells. MCS doubled their size in a 48 h period indicating that cells retained their ability to proliferate (Fig. 4B). More interestingly, both types of cells showed an invasive behaviour penetrating the hydrogel (Fig. 4C). These behaviours resembled those observed when SCC38 and 786-O cells were assembled into collagen matrices using the classical hanging drop technology [27,28] (Supplementary data, Fig. S4). Thus collagen/alginate/gelatin hydrogels are suitable for cancer cell bioprinting and seem to properly mimic the extracellular matrix such that they allow cell adherence and proliferation to assemble multicellular spheroids.

3.4. Viability and proliferation of bioprinted cancer cells

786-O cells were embedded into hydrogels and printed as scaffolds with bottom solid hydrogel layers. In this setting, printed cells scattered as single cells within the hydrogel. Bright-field microscopy allowed

visualization of cells within the scaffolds. To better distinguish cells, a stable population of 786-O cells expressing green fluorescent (GFP) protein was generated. These cells were mixed with the hydrogel and subsequently bioprinted as indicated above. Fig. 5 shows that individual cells could be visualized in- or out-of focus indicating they are at different Z-positions within the hydrogel. The number of cells doubled after about 15 days of culture indicating that bioprinted cells do proliferate with lower rate than not-bioprinted cells, thus more closely resembling native cancer cell behaviour. It takes about three to six months for most tumors to double their size [29].

Bioprinted cancer cells could be cultured for long periods of time and remained viable during that time (over 15–20 days). Cell viability was analysed by using calcein and ethidium bromide to stain live (green) or dead (red) cells in cells not expressing GFP. As shown in Fig. 5, about 90% of bioprinted cells remained viable after 15 days of culture. In addition, single bioprinted cells seem to retain fluid dynamic and intracellular movements of the complex constituents of the cytoplasm, an intrinsic property of cells which is vital for regulating relevant physiological events. Intracellular dynamic movements were detected in single bioprinted cells by the time-lapse recordings (see Supplementary data, video 1).

3.5. Assembling of TNT-like structures in 786-O cells cultured as monolayers and bioprinted models

TNT-like connections have been spotted in different types of cancer cells, including SCC38 cells, when they are grown as monolayers, but there is no evidence for the existence of TNT-like structures in cells derived from renal cancer. Moreover, it is unknown whether bioprinted cancer cells retain their ability to assemble TNT-like projections within hydrogels. Side-by-side bright-field microscopic analysis of SCC38 and 786-O cells unveiled that 786-O cells can assemble a remarkable higher number of cell-to-cell long projections than SCC38 cells and other SCC-derived cells [26] (Supplementary data, Fig. S5). Thus, subsequent studies were focused on 786-O cells to ascertain whether they retained their ability to assemble functional TNT-like projections with the aim of

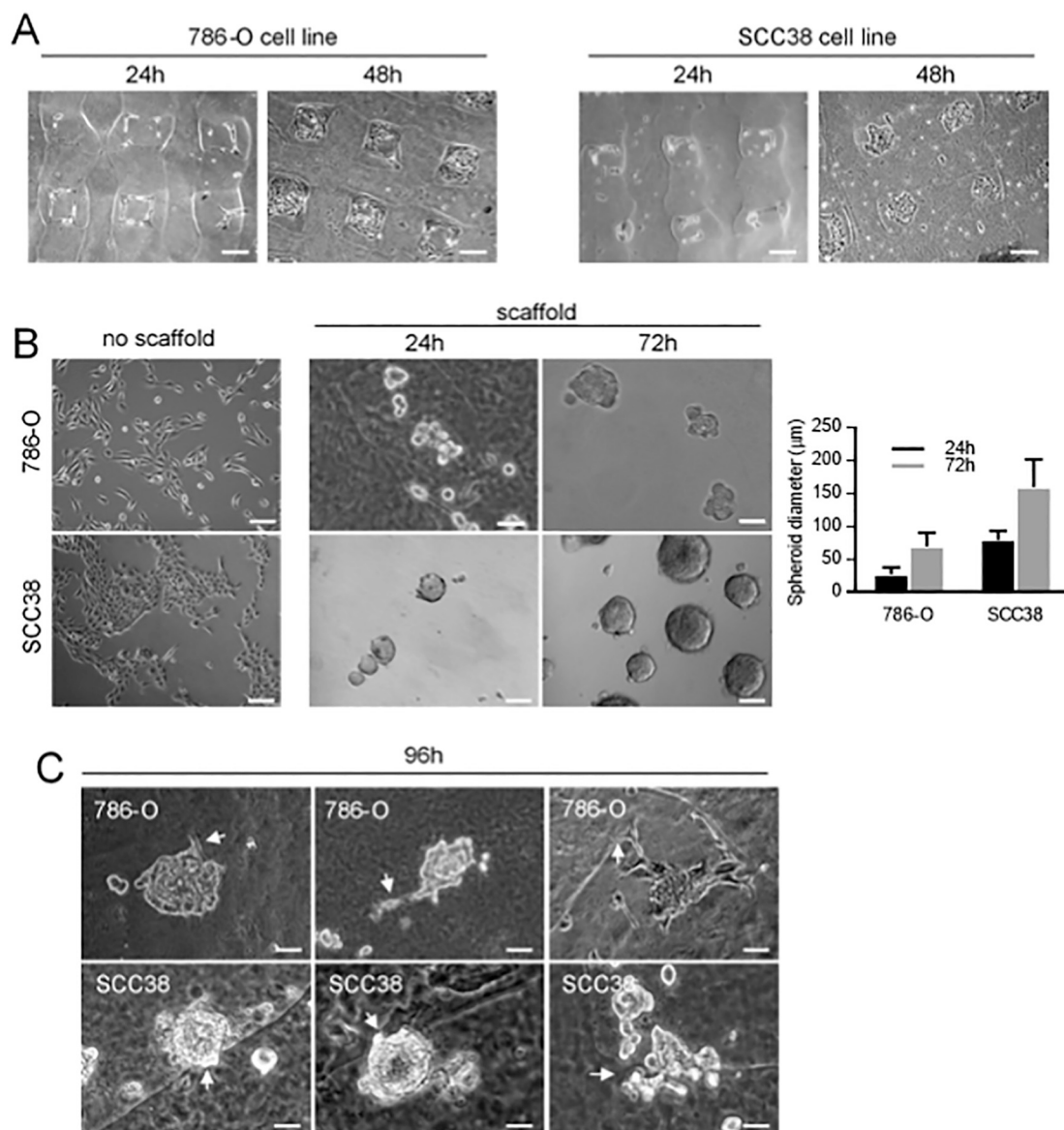


Fig. 4. Cancer cells are viable and proliferate as multicellular spheroids when seeded on the top of bioink surfaces. 786-O and SCC38 cells were seeded on top of regular scaffold (A) or scaffold with bottom solid layer (B –right pictures–, and C) and incubated for the indicated periods of time (h, hours). In panel B (left pictures), cells were seeded in regular culture plates to highlight that, under these conditions, cells growth as monolayers adhered to the plate surface. Bar chart on the right represents spheroids diameters in the indicated cells growth on top of scaffold with bottom solid. (C) Representative images of 786-O and SCC38 cells seeded on the top of scaffold with bottom solid layer and subsequently incubated for 96 h. As shown, that the two types of cells are capable of invading the bioinks (white arrows point to invasive cells). Scale bars: 500 μm (A), 100 μm (B, except for top middle and right pictures: 50 μm) and 50 μm (C).

providing a highly accessible, more physiological, controlled and reproducible 3D model than the 2D culture system or tumor tissues.

A first analysis was performed in cells cultured under conventional 2D planar culture conditions. As shown in Fig. 6, 786-O cells grown as 2D monolayers generated thin tube structures that connected distant cells forming membrane bridges. Immunostainings of α -tubulin and β -actin showed that both cytoskeleton proteins were localized inside the cell projections. Immunofluorescence analysis using anti-LAMP1 and anti-LC3B antibodies, as lysosome and autophagosome markers, respectively, revealed that the two types of subcellular organelles were present in the cell projections. Moreover, cell labelling with mitotracker showed that they also contained mitochondria which were able to travel inside the channel. The average migration rate of mitochondria was about 30 $\mu\text{m}/\text{h}$ which was similar to that described in other cancer cells [26].

To determine whether bioprinted cells retained their ability to

assemble TNT-like structures, we first verified that the presence of the hydrogel in a regular cell culturing system did not impair assembling of those structures (Fig. 7A). Next, cells were encapsulated in printed scaffolds and subsequently video recorded. Fig. 7B shows that printed cells actually assembled TNT-like projections connecting distant cells (see Supplementary data, video 2). To determine whether those structures were functional, the exchange of mitochondria between connected cells via TNT was studied. To this end, GFP-expressing cells were bioprinted, cultured for 35 days and subsequently labelled with mitotracker. Bioprinted cells were recorded by time-lapse microscopy to register mitochondria movement. Fig. 8 illustrates the sequence of images over time demonstrating the migration of mitotracker-containing vesicles along the TNTs-like projections with an average migration rate similar to that of cells growth as 2D-monolayer (about 33 $\mu\text{m}/\text{h}$).

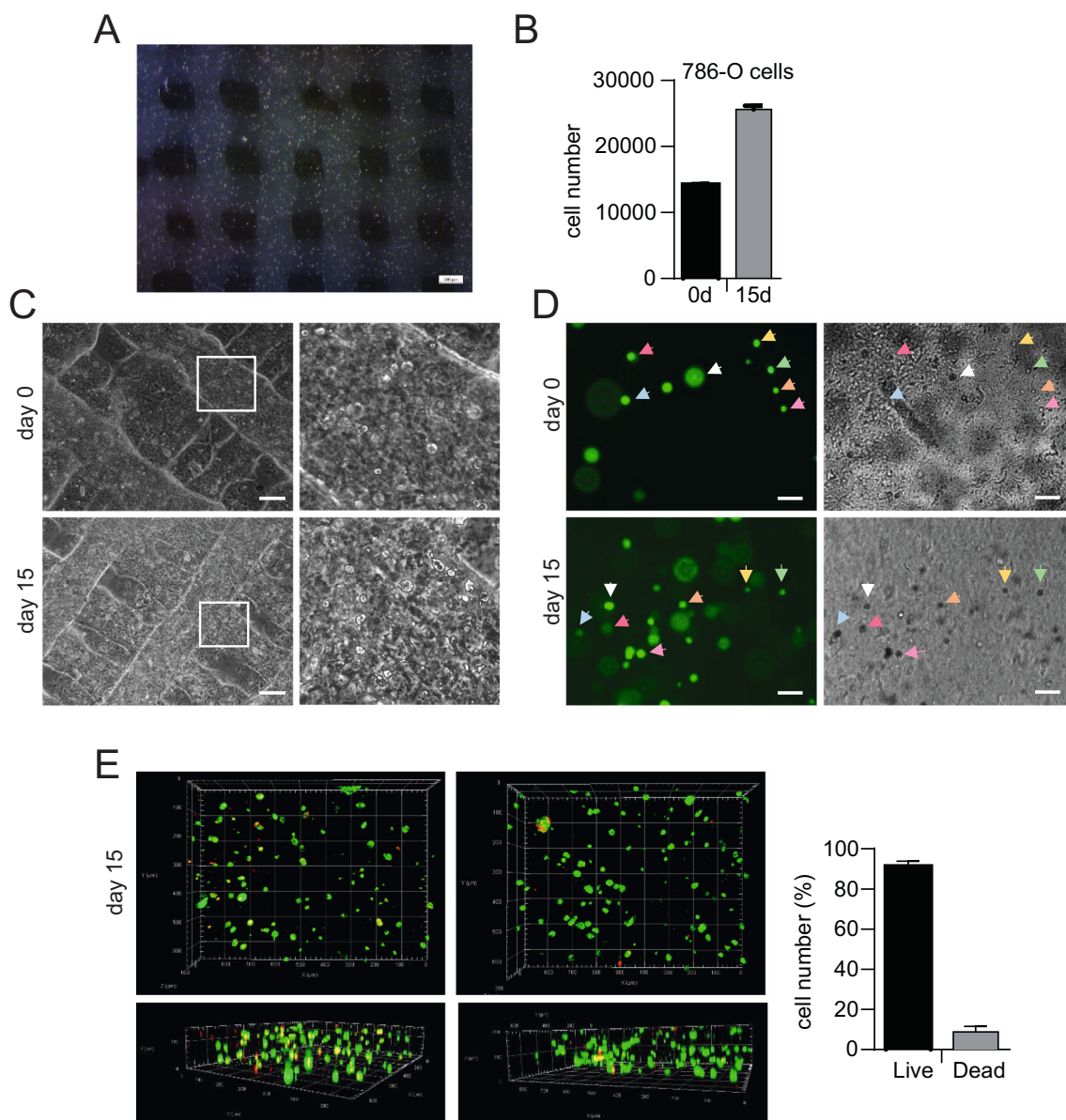


Fig. 5. Bioprinted cancer cells are viable and proliferate over long periods of time. 786-O cells were embedded into the bioink, printed as scaffolds with bottom solid layer and photographed either immediately after printing or after incubation for 15 or 20 days. (A) A representative image showing an overview of the scaffold structure and the printed cells (bright dots) after 20 days of incubation. (B) Quantification of the number of cells immediately after printing (0 d) or after 15 days (15 d) of incubation. (C–E) Representative images of printed scaffolds photographed immediately after printing (day 0) or after 15 days of incubation. In panel C, magnified images of the framed areas are shown. (D) 786-O cells were stably transfected with GFP protein before printing in the scaffolds to obtain better visualization of printed cells. Images show microscopic fluorescence and brightfield pictures of the same region of the scaffolds. Arrows point to individual cells expressing GFP protein. As shown, there are cells out of focus because of their location at different z positions. (E) Printed cells were incubated for 15 days and subsequently stained with Live-Dead Assay Kit which label live and dead cells in green and red, respectively. The percentage of cells was estimated from a total of 340 cells counted in 4 independent experiments. Images were captured using fluorescence microscopy and represent a stack of 15 sections with a total physical length of 140 μm (left panel) or 20 sections with a total physical length of 190 μm (right panel). xy (upper pictures) and xz (lower pictures) projections of the same scaffold are shown. Scale bars: 500 μm (A, C); 100 μm (D). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Discussion

Cell-to-cell and cell-environment interactions are responsible for cell differentiation, proliferation, gene and protein expression, drug metabolism, and other cellular functions that are essential for the multicellular systems. In this study, we explored the creation of three-dimensional bioprinted cell-systems to be used as models for the observation of cancer cell behaviour and communication.

Investigation in bioink composition and rheological behaviour was a major step for the acquisition of successfully bioprinted. Although

collagen/alginate/gelatin mixtures have been previously used in 3D bioprinting [30], its application on cancer cell studies has not been established or reported to date. Moreover, appropriate configuration of printing parameters (as layer height, printing speed or infill density) were also indispensable to achieve resistant structures that remained unchanged in time in culture conditions. It is widely accepted that shear-thinning inks are favourable for extrusion-driven bioprinting, since this behaviour allows the fluid to flow easily when passing through a narrow nozzle that increases the shear forces applied to the ink [31–33]. Furthermore, some viscoelastic properties, as self-supporting ability, or

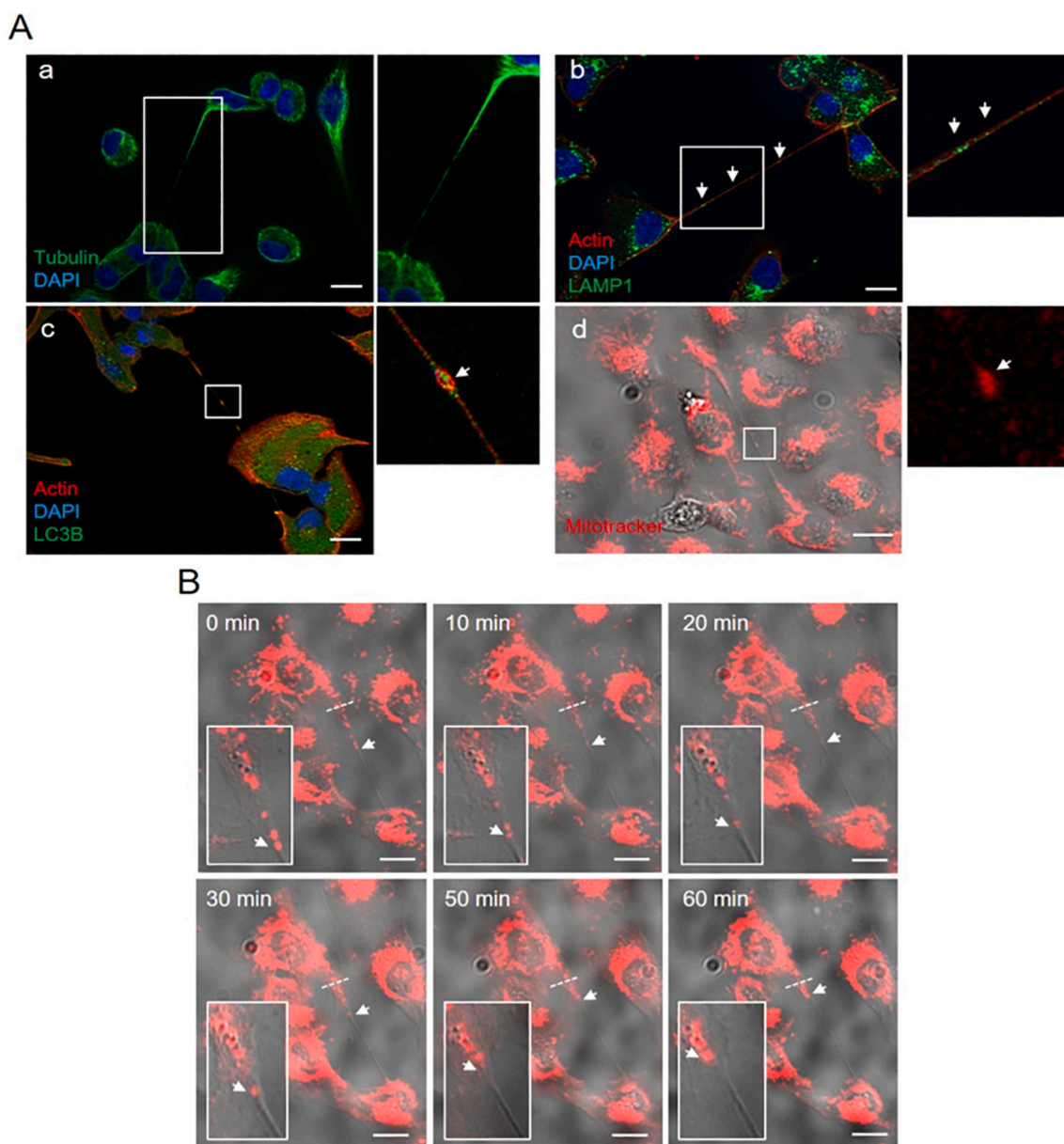


Fig. 6. TNT-like structures formed by 786-O cells grown as monolayers and mitochondria trafficking. (A) a–c Representative fluorescence microscopic images of cells stained for tubulin, actin, LAMP1 and LC3B as indicated in each picture. Cell nuclei are stained with DAPI in blue. (d) Representative merged transmitted light and fluorescence images of cells labelled with mitotracker (red). Magnified images of the framed areas are shown to better visualize lysosomes (b), autophagosomes (c) and mitochondria (d) inside the TNTs. White arrows point to the different organelles. (B) Representative merged transmitted light and fluorescence images from time-lapse movies at the indicated times. 786-O cells were labelled in vitro with red mitotracker. White arrows point to the migrating mitochondria. Dashed white lines highlight one of the two the endpoints of the TNTs taken as a reference. Scale bars: 20 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

sufficient mechanical strength of the gel, are highly desirable to avoid the collapse of the growing 3D object [15,34]. In that way, due to the slow recovery of the mixtures tested, a sol-gel transition effect was induced by keeping the extruder in a free-flow ink temperature and the printing bed in a colder temperature, which caused instant gelation of the bioink when reaching the platform and the generation of an accurate mesh. The chemical crosslinking between alginate and Ca^{2+} ions of the CaCl_2 solution and collagen polymerization under normal culture conditions (37 °C and neutral pH \sim 7.4) [35] helped in achieving strengthen and resistant structures, avoiding swelling and remaining undamaged through long periods of time (up to 31 days).

The use of two different model configurations —scaffold with or without bottom solid layer—, gave us the opportunity to analyse how cancer cells interact with the composite hydrogels. Both, renal- and

larynx SCC-derived cells tended to adhere to the glass surface within the scaffold gaps when they were seeded in scaffolds without bottom solid layer. Remarkably, although cells did not adhere to the hydrogel, they initially established contacts with it, being placed in the boundaries of the scaffold windows thus indicating that there is certain cell tropism for the hydrogel components. Further, these cells spread, proliferated in the scaffold windows, and even penetrated the scaffold thus showing that they retained proliferative and invasive properties. By contrast, cells seeded on scaffolds with bottom solid layer formed MCS. The MCS generated under these conditions were highly similar in morphology and growth rate to those formed by the classical hanging drop protocol. This demonstrates that, under these culture conditions, the two types of cancer cells tested retain the intrinsic property of self-aggregation which is typical of cancer cells [36]. These MCS resemble pseudo-tumors and

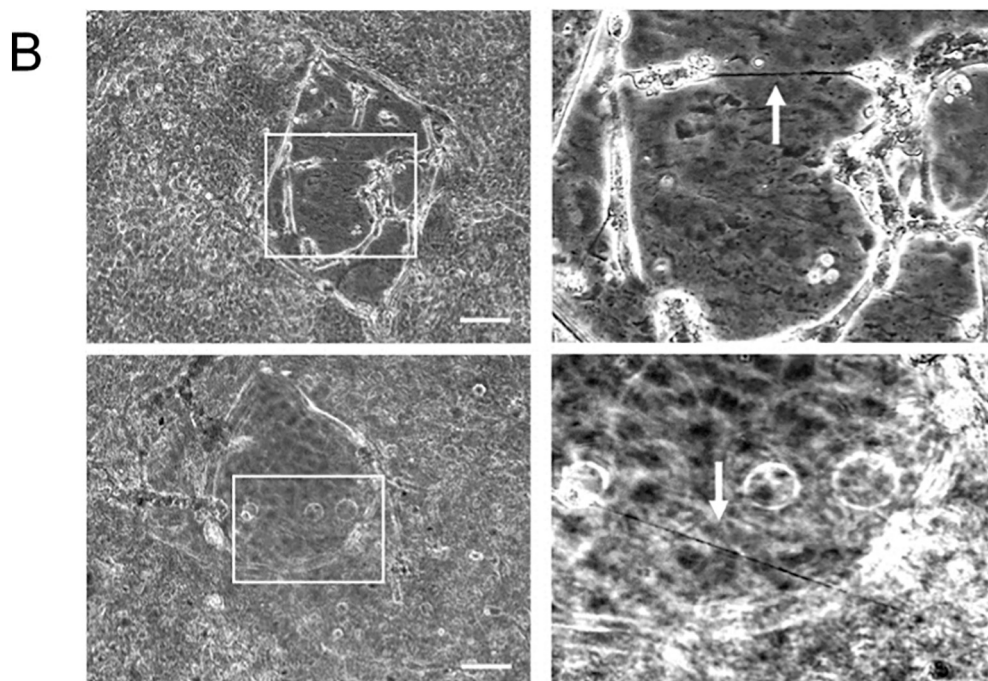
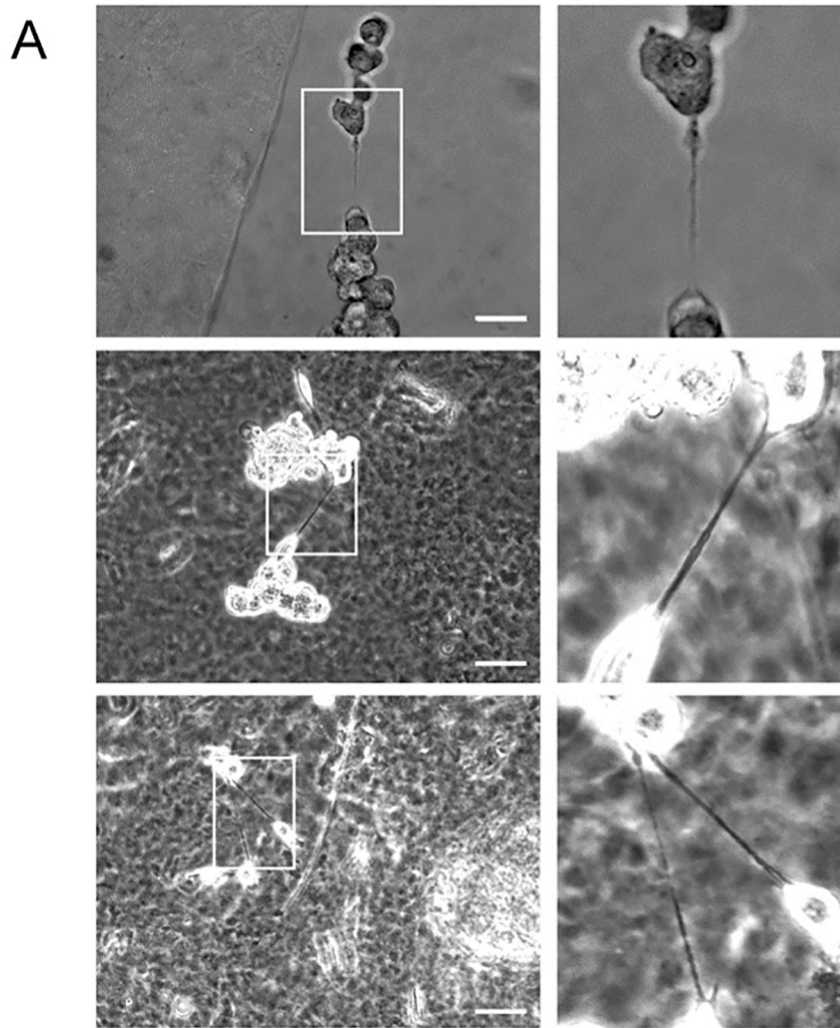


Fig. 7. Printed 786-O cancer cells retain their ability to form TNT-like structures. Cells were seeded on top scaffolds with bottom solid layer (A) or bioprinted (B). White arrows point to TNT-like projections. Magnified images of the framed areas are shown. Scale bars: 50 μm (A), 100 μm (B).

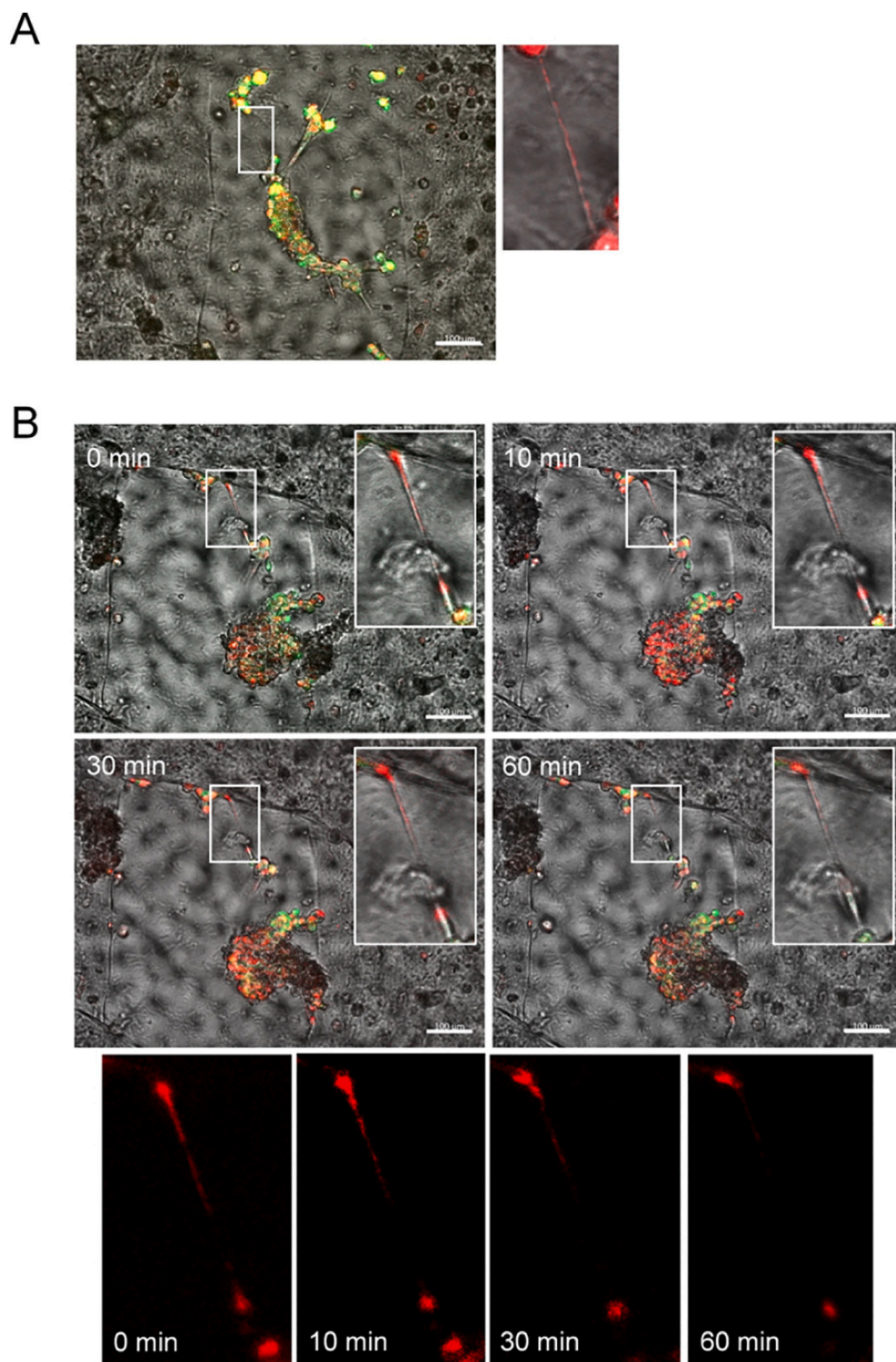


Fig. 8. Mitochondria trafficking through TNT-like projections in biprinted 786-O cells. GFP-expressing 786-O cells were labelled with mitotracker before bioprinting. Bioprinted cells were maintained in culture for 35 days before tracking analysis. Representative merged transmitted light and fluorescence images from time-lapse movies at the indicated time points are shown in A and B. Fluorescence images of the TNT highlighted in B (upper pictures) are shown in the bottom to show the migratory behaviour of labelled mitochondria along the TNT. Scale bars: 100 μ m.

constitute one of the most reliable models for cancer research since, as opposed, cells cultured in 2D adhered to the culture plate, MCSs faithfully recapitulate cancer cell behaviour in complex organisms. Therefore, the designed hydrogels are suitable for the assembly of MCS of renal- and SCC-derived cells and provide a valuable setting for studies of pathologically relevant cancer cell phenotypes. Observing that two cancer cells lines derived from unrelated type of cancers show similar behaviour, suggest that the model could be more broadly implemented in research of other types of cancer. A handicap of this model, however, is the lack of cell-extracellular components interactions, which was

overcome directly bioprinting scaffolds with embedded cells.

In that sense, the bioprinting settings and hydrogel composition described are useful as proof-of-concept model that allow cancer cell bioprinting and the observation of direct cell-to-cell communication via TNT-like protrusions. It also provides evidence that mitochondria, the cell's energy-generating structures, scroll through TNT-like projections. However, additional approaches will be required to definitively demonstrate whether these and/or other organelles are transferred from one cell to another via those projections. TNT-like structures and transferring of diverse cargo have been described in different types of

cancer cells [8] but, to the best of our knowledge, they have not been previously spotted in renal cancer cells. According to recent reports [37], the cell projections identified in 786-O cells fulfil criteria to be defined as TNTs-like structures.

They are actin-containing structures that establish continuous membrane connections between cells, do not adhere to substratum, and transport mitochondria. Importantly, these structures were not only detected in 2D cultured cells and MSCs but also in bioprinted cells. This indicates that TNT-like projections are not an artefact caused by the features inherent to cell cultures such as the artificial adhesion of cells to plastic/glass surfaces and lack of cell-extracellular components interactions. They can be assembled inside a complex 3D structure, connect distant cells, and enable mitochondria trafficking.

The role of TNT-like structures in cancer is still under active investigation [10]. While they have been identified in many types of cancer cell cultures using light microscopy [8], their detection in more complex contexts, such as tumor tissues, is still challenging due to their scarce molecular characterization and the high cellular density of the tumor tissues. Similar disadvantages emerge when trying to identify TNT-like structures within MCSs where cells are very densely packed. These are major handicaps for the functional characterization of TNT-like structures in cancer and other diseases. Therefore, controlled and highly reproducible 3D models are urgently needed to design the experimental approaches required for the understanding of the role of TNT-like structures in cancer progression and drug resistance, and exploit this knowledge for improving cancer treatment options. The integration of bioprinting methods and microscopic analysis of TNT-like structures connecting distant cells within 3D matrices, offers now the opportunity of exploring the role of these unconventional ways of communications between cells in cancer and many other diseases in a controlled 3D microenvironment.

5. Conclusions

We report here a 3D bioprinted cancer model for the investigation of intercellular communication, via TNT-like structures, in a highly controlled and reproducible environment resembling the *in vivo* tumor ecosystem. This technology uses an optimized collagen/alginate/gelatin hydrogel and optimized printing parameters to bioprint renal cancer cells. In this context, cells are viable, proliferate for long-time periods of time, and form long and thin TNT-like structures that are used as channels for the long-distance cell-to-cell transfer of mitochondria. Identification and functional analysis of TNTs in complex contexts, such as tumor tissues or multicellular spheroids, is still challenging due to the absence of specific biomarkers and the high cellular density. The results reported here establish the potential for bioprinting cancer cells to investigate cancer cell communication via TNTs within a physiologically relevant microenvironment.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112357>.

CRedit authorship contribution statement

Helena Herrada: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing- Reviewing and Editing **Lucia Celada:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Visualization. **David Rodriguez:** Investigation; Methodology. **M Alejandro:** Conceptualization, Project administration, Supervision. **Enrique Aguilar:** Supervision, Writing- Reviewing and Editing. **María-Dolores Chiara:** Conceptualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Writing- Reviewing and Editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence

the work reported in this paper.

Acknowledgements

This research was funded by Fondo de Investigación Sanitaria grant number FIS PI20/01754 and the Centro de Investigación Biomédica en Red-Cáncer, CIBERONC, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). L.C. thanks the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades for a FPU predoctoral contract.

References

- [1] A.M. Sitariski, H. Fairfield, C. Falank, M.R. Reagan, 3D tissue engineered *in vitro* models of cancer in bone, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 324–336, <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.7b00097>.
- [2] F. Pampaloni, E.G. Reynaud, E.H.K. Stelzer, The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 839–845, <https://doi.org/10.1038/nrm2236>.
- [3] R. Edmondson, J.J. Broglie, A.F. Adcock, L. Yang, Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors, *Assay Drug Dev. Technol.* 12 (2014) 207–218, <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>.
- [4] A. Doctor, V. Seifert, M. Ullrich, S. Hauser, J. Pietzsch, Three-dimensional cell culture systems in radiopharmaceutical cancer research, *Cancers (Basel)* 12 (2020) 1–28, <https://doi.org/10.3390/cancers12102765>.
- [5] D. Herrmann, J.R.W. Conway, C. Vennin, A. Magenau, W.E. Hughes, J.P. Morton, P. Timpson, Three-dimensional cancer models mimic cell-matrix interactions in the tumour microenvironment, *Carcinogenesis*. 35 (2014) 1671–1679, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu108>.
- [6] A.A.A. Al-Juboori, A. Ghosh, M.F. Bin Jamaluddin, M. Kumar, S.S. Sahoo, S. M. Syed, P. Nahar, P.S. Tanwar, Proteomic analysis of stromal and epithelial cell communications in human endometrial cancer using a unique 3D co-culture model, *Proteomics*. 19 (2019), 1800448, <https://doi.org/10.1002/pmic.201800448>.
- [7] S.A. Langhans, Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning, *Front. Pharmacol.* 9 (2018), <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>.
- [8] G. Pinto, C. Brou, C. Zurzolo, Tunneling nanotubes: the fuel of tumor progression? *Trends Cancer* 6 (2020) 874–888, <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.04.012>.
- [9] A. Rustom, Nanotubular highways for intercellular organelle transport, *Science* (80-.) 303 (2004) 1007–1010, <https://doi.org/10.1126/science.1093133>.
- [10] M. Baker, How the Internet of cells has biologists buzzing, *Nature*. 549 (2017) 322–324, <https://doi.org/10.1038/549322a>.
- [11] J.R. Browning, P. Derr, K. Derr, N. Doudican, S. Michael, S.R. Lish, N.A. Taylor, J. G. Krueger, M. Ferrer, J.A. Carucci, D.S. Gareau, A 3D biofabricated cutaneous squamous cell carcinoma tissue model with multi-channel confocal microscopy imaging biomarkers to quantify antitumor effects of chemotherapeutics in tissue, *Oncotarget*. 11 (2020) 2172–2181, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27570>.
- [12] E.M. Langer, B.L. Allen-Petersen, S.M. King, N.D. Kendersky, M.A. Turnidge, G. M. Kuziel, R. Riggers, R. Samatham, T.S. Amery, S.L. Jacques, B.C. Sheppard, J. E. Korkola, J.L. Muschler, G. Thibault, Y.H. Chang, J.W. Gray, S.C. Presnell, D. G. Nguyen, R.C. Sears, Modeling tumor phenotypes *in vitro* with three-dimensional bioprinting, *Cell Rep.* 26 (2019) 608–623.e6, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.090>.
- [13] S. Knowlton, S. Onal, C.H. Yu, J.J. Zhao, S. Tasoglu, Bioprinting for cancer research, *Trends Biotechnol.* 33 (2015) 504–513, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.007>.
- [14] A. Mondal, A. Gebeyehu, M. Miranda, D. Bahadur, N. Patel, S. Ramakrishnan, A. K. Rishi, M. Singh, Characterization and printability of sodium alginate-gelatin hydrogel for bioprinting NSCLC co-culture, *Sci. Rep.* 9 (2019) 19914, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55034-9>.
- [15] A. Schwab, R. Levato, M. D'Este, S. Piluso, D. Eglin, J. Malda, Printability and shape fidelity of bioinks in 3D bioprinting, *Chem. Rev.* 120 (2020) 11028–11055, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00084>.
- [16] I.T. Ozbolat, K.K. Moncal, H. Gudapati, Evaluation of bioprinter technologies, *Addit. Manuf.* 13 (2017) 179–200, <https://doi.org/10.1016/j.addma.2016.10.003>.
- [17] C. Lee, E. Abelseh, L. de la Vega, S.M. Willerth, Bioprinting a novel glioblastoma tumor model using a fibrin-based bioink for drug screening, *Mater. Today Chem.* 12 (2019) 78–84, <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.12.005>.
- [18] J. Bae, S. Han, S. Park, Recent advances in 3D bioprinted tumor microenvironment, *BioChip J.* 14 (2020) 137–147, <https://doi.org/10.1007/s13206-020-4201-8>.
- [19] S. Amorim, D. Soares Da Costa, I. Pashkuleva, C.A. Reis, R.L. Reis, R.A. Pires, 3D hydrogel mimics of the tumor microenvironment: the interplay among hyaluronic acid, stem cells and cancer cells, *Biomater. Sci.* 9 (2021) 252–260, <https://doi.org/10.1039/d0bm00843e>.
- [20] S. Mao, Y. Pang, T. Liu, Y. Shao, J. He, H. Yang, Y. Mao, W. Sun, Bioprinting of *in vitro* tumor models for personalized cancer treatment: a review, *Biofabrication*. 12 (2020), 042001, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab97c0>.
- [21] M.G. Sánchez-Salazar, M.M. Álvarez, G. Trujillo-de Santiago, Advances in 3D bioprinting for the biofabrication of tumor models, *Bioprinting*. 21 (2021), e00120, <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00120>.
- [22] P. Datta, M. Dey, Z. Ataie, D. Unutmaz, I.T. Ozbolat, 3D bioprinting for reconstituting the cancer microenvironment, *NPJ Precis. Oncol.* 4 (2020), <https://doi.org/10.1038/s41698-020-0121-2>.

- [23] B.S. Kim, W. Cho, G. Gao, M. Ahn, J. Kim, D. Cho, Construction of tissue-level cancer-vascular model with high-precision position control via in situ 3D cell printing, *Small Methods* (2021), <https://doi.org/10.1002/smt.202100072>.
- [24] H. Li, S. Liu, L. Lin, Rheological study on 3D printability of alginate hydrogel and effect of graphene oxide, *Int. J. Bioprinting* 2 (2016) 10–12, <https://doi.org/10.18063/IJB.2016.02.007>.
- [25] Y. Hekmatshoar, J. Nakhle, M. Galloni, M.L. Vignais, The role of metabolism and tunneling nanotube-mediated intercellular mitochondria exchange in cancer drug resistance, *Biochem. J.* 475 (2018) 2305–2328, <https://doi.org/10.1042/BCJ20170712>.
- [26] I. Sáenz-de-Santa-María, C. Bernardo-Castiñeira, E. Enciso, I. García-Moreno, J. L. Chiara, C. Suarez, M.D. Chiara, Control of long-distance cell-to-cell communication and autophagosome transfer in squamous cell carcinoma via tunneling nanotubes, *Oncotarget*. 8 (2017) 20939–20960, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15467>.
- [27] C. Bernardo-Castiñeira, N. Valdés, L. Celada, A.S.J. Martínez, I. Sáenz-De-Santa-María, G.F. Bayón, A.F. Fernández, M.I. Sierra, M.F. Fraga, A. Astudillo, P. Jiménez-Fonseca, J.C. Rial, M.Á. Hevia, E. Turienzo, C. Bernardo, L. Forga, I. Tena, M.J. Molina-Garrido, L. Cacho, C. Villabona, T. Serrano, B. Scola, I. Chirivella, M. Del Olmo, C.L. Menéndez, E. Navarro, M. Tous, A. Vallejo, S. Athimulam, I. Bancos, C. Suarez, M.D. Chiara, Epigenetic deregulation of protocadherin PCDHGC3 in pheochromocytomas/paragangliomas associated with SDHB mutations, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104 (2019) 5673–5692, <https://doi.org/10.1210/je.2018-01471>.
- [28] I. Sáenz-de-Santa-María, L. Celada, M.-D. Chiara, The leader position of mesenchymal cells expressing N-cadherin in the collective migration of epithelial cancer, *Cells*. 9 (2020) 731, <https://doi.org/10.3390/cells9030731>.
- [29] T.-K. Yoo, J.W. Min, M.K. Kim, E. Lee, J. Kim, H.-B. Lee, Y.J. Kang, Y.-G. Kim, H.-G. Moon, W.K. Moon, N. Cho, D.-Y. Noh, W. Han, In vivo tumor growth rate measured by US in preoperative period and long term disease outcome in breast Cancer patients, *PLoS One* 10 (2015), e0144144, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144144>.
- [30] Z. Wu, X. Su, Y. Xu, B. Kong, W. Sun, S. Mi, Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–10, <https://doi.org/10.1038/srep24474>.
- [31] P.T. Smith, A. Basu, A. Saha, A. Nelson, Chemical modification and printability of shear-thinning hydrogel inks for direct-write 3D printing, *Polymer (Guildf)* 152 (2018) 42–50, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.01.070>.
- [32] N. Paxton, W. Smolan, T. Böck, F. Melchels, J. Groll, T. Jungst, Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability, *Biofabrication*. 9 (2017), 044107, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa8dd8>.
- [33] I. Díaz, C. Gallegos, E. Brito-de la Fuente, I. Martínez, C. Valencia, M.C. Sánchez, M.J. Díaz, J.M. Franco, 3D printing in situ gelification of κ -carrageenan solutions: effect of printing variables on the rheological response, *Food Hydrocoll.* 87 (2019) 321–330, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.010>.
- [34] A.C. Heidenreich, M. Pérez-Recalde, A. González Wusener, É.B. Hermida, Collagen and chitosan blends for 3D bioprinting: a rheological and printability approach, *Polym. Test.* 82 (2020), 106297, <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.106297>.
- [35] A.D. Doyle, Generation of 3D collagen gels with controlled diverse architectures, *Curr. Protoc. Cell Biol.* 72 (2016) 1–22, <https://doi.org/10.1002/cpcb.9>.
- [36] A.K. Mishra, J.P. Campanale, J.A. Mondo, D.J. Montell, Cell interactions in collective cell migration, *Development*. 146 (2019), <https://doi.org/10.1242/dev.172056> dev172056.
- [37] D. Cordero Cervantes, C. Zurzolo, Peering into tunneling nanotubes—the path forward, *EMBO J.* (2021), e105789, <https://doi.org/10.15252/embj.2020105789>.

Article

Effect on Rheological Properties and 3D Printability of Biphasic Calcium Phosphate Microporous Particles in Hydrocolloid-Based Hydrogels

Helena Herrada-Manchón ^{1,2,*}, David Rodríguez-González ^{1,2} , Manuel Alejandro Fernández ², Nathan William Kucko ³, Florence Barrère-de Groot ³ and Enrique Aguilar ¹ 

- ¹ Centro de Innovación en Química Avanzada (ORFEO-CINQA), Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Instituto Universitario de Química Organometálica “Enrique Moles”, Universidad de Oviedo, C/Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain; davidrgezglez@gmail.com (D.R.-G.); eah@uniovi.es (E.A.)
- ² Fundación Idonial, Parque Científico y Tecnológico de Gijón, Avda, Jardín Botánico 1345, 33203 Gijón, Spain; alejandro.fernandez@idonial.com
- ³ Kuros Biosciences BV, Professor Bronkhorstlaan 10, Building 48, 3723 MB Bilthoven, The Netherlands; Nathan.Kucko@kurosbio.com (N.W.K.); florence.de.groot@kurosbio.com (F.B.-d.G.)
- * Correspondence: helena.herrada@idonial.com

Abstract: The production of patient-specific bone substitutes with an exact fit through 3D printing is emerging as an alternative to autologous bone grafting. To the success of tissue regeneration, the material characteristics such as porosity, stiffness, and surface topography have a strong influence on the cell–material interaction and require significant attention. Printing a soft hydrocolloid-based hydrogel reinforced with irregularly-shaped microporous biphasic calcium phosphate (BCP) particles (150–500 μm) is an alternative strategy for the acquisition of a complex network with good mechanical properties that could fulfill the needs of cell proliferation and regeneration. Three well-known hydrocolloids (sodium alginate, xanthan gum, and gelatin) have been combined with BCP particles to generate stable, homogenous, and printable solid dispersions. Through rheological assessment, it was determined that the crosslinking time, printing process parameters (infill density percentage and infill pattern), as well as BCP particle size and concentration all influence the stiffness of the printed matrices. Additionally, the swelling behavior on fresh and dehydrated 3D-printed structures was investigated, where it was observed that the BCP particle characteristics influenced the constructs’ water absorption, particle diffusion out of the matrix and degradability.

Keywords: 3D printing; biphasic calcium phosphate; hydrogels; rheology; solid dispersions



Citation: Herrada-Manchón, H.; Rodríguez-González, D.; Fernández, M.A.; Kucko, N.W.; Barrère-de Groot, F.; Aguilar, E. Effect on Rheological Properties and 3D Printability of Biphasic Calcium Phosphate Microporous Particles in Hydrocolloid-Based Hydrogels. *Gels* **2022**, *8*, 28. <https://doi.org/10.3390/gels8010028>

Academic Editor: Yongsung Hwang

Received: 2 December 2021

Accepted: 27 December 2021

Published: 2 January 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The working principle of 3D printing is that objects can be created by adding material in a layer-by-layer manner via automated deposition and computer-aided design/computer-aided manufacturing (CAD/CAM) systems. Since the repair of large-area and complex-shape bone defects remains a significant challenge, the 3D printing of on-demand bone graft biomaterials has been emerging as an alternative to autografts in the last few years [1–3]. As a replacement to autografts, synthetic bone graft biomaterials are available in unlimited quantities and have the advantage of being sterile and do not carry a risk of disease transfer. Moreover, they have the added benefit of eliminating the need for invasive harvesting of autologous bone, which can lead to donor-site morbidity [4–6]. Furthermore, synthetic bone graft biomaterials provide the ability to control the shape, size, surface morphology and internal porosity of the final 3D-printed product, thereby facilitating the ability to deliver fully personalized solutions for repairing difficult, critical-size bone trauma defects.

Amongst all the 3D-printing technologies developed, extrusion-based printing of gels—commonly known as semi-solid extrusion (SSE)—has been widely used due to its

exceptional capability of accommodating a diverse range of printable fluids whose viscosities range from 30 mPa s^{-1} to just under $6 \times 10^7 \text{ mPa s}^{-1}$ [7,8]. Although considerable work has been done in developing functional ceramic inks and bioinks, i.e., biological cocktails of ceramic materials, cells, growth factors or drugs, among others, many extrudable combinations are only capable of printing simple structures that are only a few millimeters tall due to limitations in flow characteristics [8,9]. More promising results in precisely replicating centimeter-scale bone segments have been obtained with ready-to-use commercial pastes [3,10,11] or formulations loaded with small ($<30 \mu\text{m}$) spherical powders, which have better fluidity than irregularly shaped powders and are more convenient to 3D print [9,12–14]. However, it has been widely reported that surface architecture, geometry, and microporosity are essential factors for osteoconduction (the ability to form new bone on the surface of biomaterials) and, in some cases, osteoinduction (induction of de novo bone formation through cellular differentiation into bone-forming cells) [4,7,15–18]. Due to the latter, exploring the printability of irregularly shaped, microporous biphasic calcium phosphate (BCP) granules $150\text{--}500 \mu\text{m}$ in size with a characteristic submicron surface structure is of particular interest. BCP consists of a mixture of hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (β -TCP), which are materials that are widely used in the field of bone regeneration due to their excellent biocompatibility and osteostimulatory properties that are attributed to their similar chemical composition to the inorganic phase of bone [13,15,17]. Furthermore, the BCP granules used in this study have a characteristic submicron surface structure that has been shown to be osteoinductive and demonstrated enhanced orthotopic bone formation compared to other conventional calcium phosphate bone substitutes [4].

The use of hydrogels as particle carriers is a straightforward approach for the fabrication of bone graft substitutes. Nevertheless, the combination of this hydrocolloid-based vehicle with BCP particles must result in compositions that exhibit a proper rheology, viscosity, and gelation time, for acquiring steady multi-layered final constructs. For SSE 3D printing, shear-thinning and viscoelastic fluids are highly desirable, as they can be easily extruded through a nozzle and rapidly recover the viscosity and mechanical strength necessary to support the next layer extruded [19–22]. Due to the physical characteristics of the BCP particles (size, weight, and agglomeration trend), three well-known hydrocolloids (sodium alginate, xanthan gum, and type A gelatin) have been combined, exploiting their different intrinsic properties as thickeners and/or gelling agents, to generate stable, homogenous, and printable solid dispersions which, to the best of our knowledge, have not been previously explored. In parallel, in the case of repairing bone defects, accumulating evidence indicates that the matrix stiffness, viscoelasticity, and topography have potent effects on cell behavior, resulting in better osteointegration and osteoinduction [4,23,24]. Therefore, it is necessary to investigate the relationship between the biomechanical properties of the hydrogels in terms of stiffness (elastic modulus), loading percentage of BCP granules, and crosslinking time. In addition, when dealing with 3D-printed constructs, the stiffness will differ according to the configuration of the printing process parameters, such as the infill density and the infill pattern. Taking all this into account, the current work is directed toward the research of new ceramic inks by assessing their rheological properties, stiffness, and mechanical load resistance, which will enable a future development of customized 3D-printed bone grafts for the repair of critical-size bone defects.

2. Results and Discussion

2.1. BCP-Hydrogel Inks Composition and Formulation

The observation of the BCP granules revealed irregularly shaped particles with high microporosity and size ranges of $150\text{--}250 \mu\text{m}$ for BCP1 granules and $150\text{--}500 \mu\text{m}$ for BCP2 granules (Figure 1). Printing these particles through SSE required a carrier whose consistency was critical: it had to be fluid enough to be extruded while being thick enough to keep the particles suspended. In that sense, a biocompatible colloidal system was designed for the purpose of loading BCP granules and controlling the rheological properties to ensure

good printability. The selection of the materials (sodium alginate, gelatin, and xanthan gum) was according to the formulation needs in terms of thermoreversibility, high affinity for water, and pseudoplastic behavior with high viscosity at rest and stability under shear during processing.

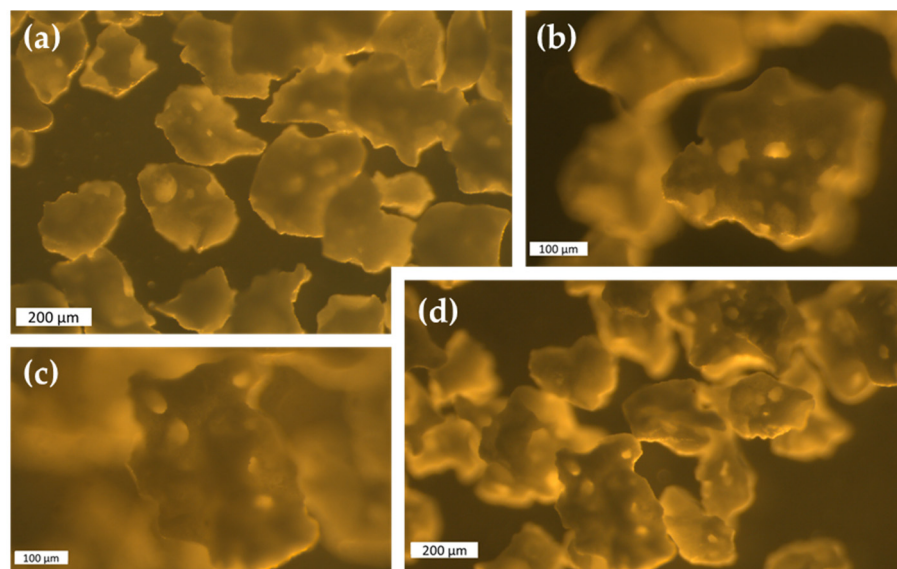


Figure 1. Stereomicroscopic images of 150–250 μm (a,b) and 150–500 μm (c,d) BCP granules. Scale bars: 200 μm (a,d), 100 μm (b,c).

Alginate is a naturally occurring anionic polymer typically obtained from brown seaweed that has been extensively investigated as a hydrogel material for tissue engineering applications due to its favorable properties such as low toxicity, biocompatibility, and easy processability. Through the addition of divalent cations, such as Ca^{2+} , alginate undergoes a gelation process where the polymer chains form an “egg-box structure” with the divalent ions, giving immediate rigidity and allowing manipulation of the printed structures. However, the rheological properties of pure alginate result in poor printability and pattern fidelity, which greatly limits its use in 3D printing [25–27]. Gelatin, derived from collagen by either acid (type A) or alkaline (type B) hydrolysis, is one of the most extensively used protein hydrocolloids [28,29]. As a counterpoint to its low cost, ease of preparation, and biocompatibility, gelatin undergoes a gel-sol transition at physiological temperature (37 °C) that makes essential the induction of any crosslinking reaction (chemical, light, or pH-dependent) on the printed structures to avoid a rapid destruction in culture conditions and facilitate the handling of the samples [30–32]. In this case, gelatin provides the mixture with a thermoreversible behavior, which facilitates the incorporation of the remaining ingredients and the loading process into the syringes by staying as a viscous liquid above 37 °C. Xanthan gum is an anionic heteropolysaccharide produced by the bacteria *Xanthomonas campestris* and traditionally used as a binder, thickener, stabilizer, and bodying agent in confectionary and dairy products, as it has high stability in a wide range of pH, temperature, and ionic strength [29,33,34]. Made up of various monosaccharides, mannose, glucose, and glucuronic acids, macromolecules of xanthan can have the conformation of simple, double, or triple helicoidally flexible chains, which are able to interact to increase the viscosity of the solution and grant a highly shear-thinning behavior of the fluid [33,35]. This pseudoplastic behavior helps in mixing, pumping, filling, and pouring processes. Although xanthan gum is well known for its non-toxicity and excellent biocompatibility [36], its use has not yet been fully exploited for tissue engineering and 3D printing, with only few works being reported in the literature and none of them specifically for bone regeneration [37–39]. Xanthan gum provides yield stress and increases viscosity, allowing particles of up to a large size to remain homogeneously suspended

within the hydrogel [40]. In general, hydrogels only form if there is enough gelling agent present and the number of junction zones is sufficient to hold the entrained liquid [41]. The combination of these colloids enhances gel formation through protein/polysaccharide interactions—usually dominated by electrostatic forces—molecular entanglement, and ionic bridges. Consequently, the interactions between these biopolymers can be tuned by controlling the pH, the ionic strength, and the protein/polysaccharide ratio [28]. The incorporation of BCP granules in a high proportion in the viscous polymer solution made the mixture become thicker, behaving more similarly to a gum than a gel.

To date, much research has focused on 3D-printing inks loaded with spherical micro or nanoparticles. However, particles that are anisometric introduce several additional effects [42]. The local flow around a spherical particle is different than that of non-spherical particles which, in addition, are orientable, so the contribution to suspension viscosity is also different. Furthermore, particle interactions are strongly influenced by particle shape and, in general, the degree of interaction among non-spherical particles is greater than among spherical particles at the same concentration, as the higher specific surface enhances the probability of interactions [42]. For that purpose, the influence of particle size and proportion on the ink's behavior was assessed through different rheological tests.

2.2. Shear Viscosity Tests and Effect of Particle Loading

Particle loading is one of the factors that affect the rheology of dispersions and suspensions. Volume fraction (ϕ) measures the volume of particles divided by the total volume of the suspension, and the maximum packing fraction (ϕ_{max}) corresponds to the maximum volume of particles that could be added to a suspension, which depends on the size and the shape of the particles. The Krieger-Dougherty model (1) describes the relationship between viscosity of the material and volume fraction of solid particles for fluids with high solid content characteristics:

$$\frac{\eta}{\eta_{med}} = \left(1 - \frac{\phi}{\phi_{max}}\right)^{-[\eta]\phi_{max}}, \quad (1)$$

where η is the viscosity of the suspension, and η_{med} is the viscosity of the medium [43,44]. Following this model, the viscosity of the suspension is going to be affected by ϕ and ϕ_{max} . Thus, increasing the volume fraction increases the viscosity, as packing molecules makes flow more difficult. In this manner, the flow curves (Figure 2) reflected higher viscosity values for hydrogels loaded with 30 wt % of BCP (30BCP1 and 30BCP2). Furthermore, all the mixtures showed a decrease in viscosity when increasing shear rates, revealing clear shear-thinning properties of the BCP-hydrogels. This time-independent non-Newtonian fluid behavior is highly convenient for fluids that undergo a high shear condition while passing through a nozzle, as is the case with 3D-printing inks.

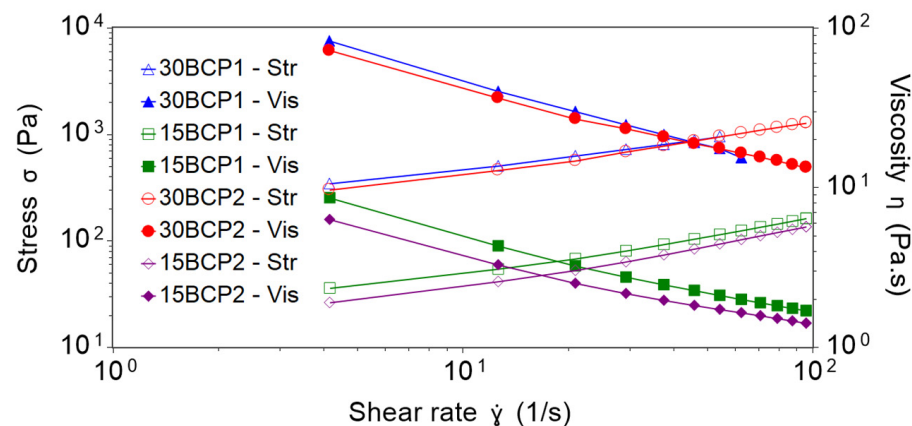


Figure 2. Shear stress (Str) and viscosity (Vis) profiles from 0.01 to 100 s⁻¹ within 120 s at 37 °C.

Shear-viscosity profiles were similar for inks with the same particle concentration, although the particle size was different. Thus, the profiles of 30BCP1 and 30BCP2 practically overlap and, in turn, 15BCP1 and 15BCP2 have closer values and the same tendency. However, 30BCP1 became shear-thickening at higher shear rates and suffered jamming, spilling the sample out of the rheometer plates and invalidating the measurements. For that reason, 30BCP1 was measured only between 0.01 and 70 s⁻¹. This effect did not occur in the case of 30BCP2, verifying the impact of particle size in the rheology of solid dispersions.

The Herschel–Bulkley mathematical model fit the experimental results with R² values higher than 0.999 for all the inks (Table 1). For the same particle concentration, the larger the size of the granules, the higher the yield stress and *K* value, denoting an increase in apparent viscosity. Similarly, the mixtures with a higher quantity of particles had a lower *n* value, and therefore, a greater pseudoplastic behavior, which was most likely due to the increase in colloidal interactions and particle–particle interactions that are easily shattered with shear.

Table 1. The Herschel–Bulkley parameters for the different inks.

	τ_0 (Pa)	<i>K</i> (Pa.s)	<i>n</i>	R ²
30BCP1	142.08	93.25	0.54	0.9999
15BCP1	21.92	4.98	0.73	1.0000
30BCP2	125.46	70.38	0.62	0.9993
15BCP2	15.38	3.66	0.77	0.9999

2.3. Thixotropy and Viscosity Recovery Analysis

Thixotropy is a time-dependent shear-thinning property that is used to characterize the structure change reversibility and can be quantitatively measured on a rotational rheometer through a Stepped Flow Method (SFM). With this three-step method, the fluid attains the state of rest in the first step, suffers a structural destruction in step two, and regenerates the structure in step three.

Tests performed at 37 °C revealed greater recovery values for inks with low particle concentration (Figure 3). However, a clear phase separation of the BCP particles from the hydrogel was observed when removing the sample from the rheometer plates. Due to the higher water content of these inks, the hydrogel was in a more liquid state at this temperature, with a diminished viscosity and internal fluid structure that hindered sustaining the BCP granules embedded in the matrix. Thus, after a high shear, the solid particles deposited in the lower layers of the sample—on the surface of the lower rheometer plate—while the hydrogel occupied the upper layers. The aggregation and compaction effect of BCP particles after a high shear resulted in viscosity recovery values higher than 100% for these inks. This behavior was also significant regarding the printing process: setting temperatures equal to or higher than 37 °C in the printhead led to a phase separation when applying a stress with the extrusion on the ink. By doing so, the hydrogel flowed freely, but the particles were retained in the nozzle, causing it to eventually clog. In this sense, SFM tests were performed at room temperature to measure the behavior of the inks in a less flowable form. In this case, the opposite phenomenon occurred: with the application of the high shear rate in the second step, samples slipped from the rheometer plates. For this reason, the recovery values obtained were low and not reliable.

Due to the inability to properly measure thixotropy at room temperature with the SFM test, samples were measured with an analogous assay based on low amplitude oscillation (SDM). The linear viscoelastic region (LVR) was determined to end when the shear modulus reached 90% of its initial value [45]. In general, the LVR is shortest when the sample is in its most solid form. As expected, the results obtained from the amplitude sweeps showed a smaller critical strain value (γ_c) for the inks with a higher concentration of BCP (30BCP1 and 30BCP2) (Figure 4a). From this test, step two of the SDM assay was set to 20% strain to ensure the destruction of the fluid structure and correctly assess its recovery. The viscosity recovery values ranged between 72% and 89% for the different inks, which are values

that allowed for a controlled deposition of the ink and a faithful execution of the models designed during 3D printing (Figure 4b). Furthermore, the samples taken from the plates after testing had a homogeneous appearance, without phase separation, thereby verifying that inks printed at temperatures around 23 °C or slightly below are maintained as a structured fluid that can withstand the application of stress during printing.

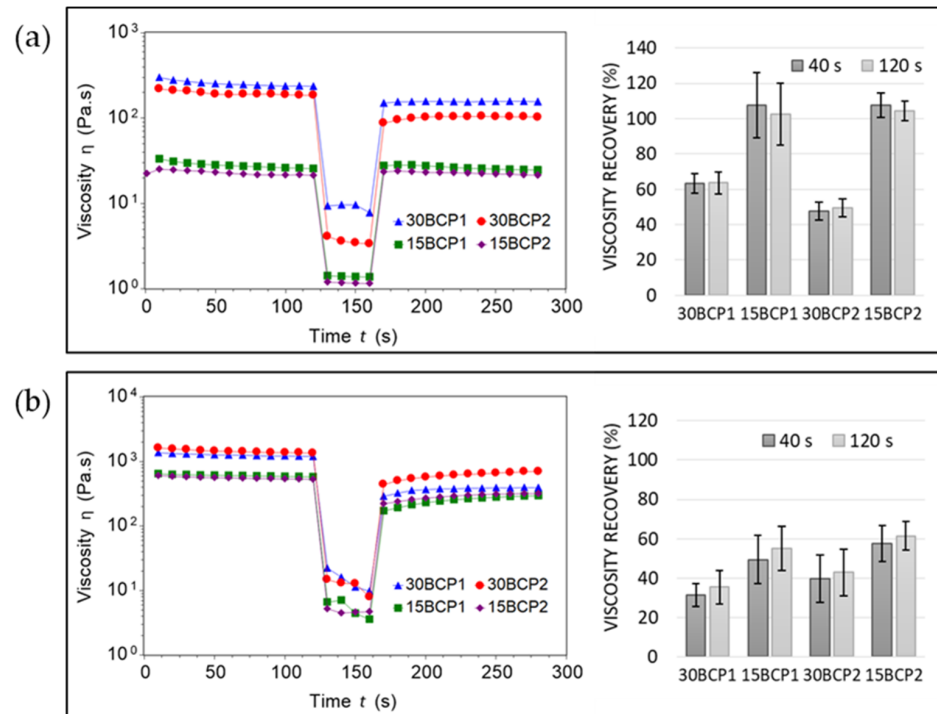


Figure 3. SFM test and viscosity recovery (%) at 37 °C (a) and 23 °C (b).

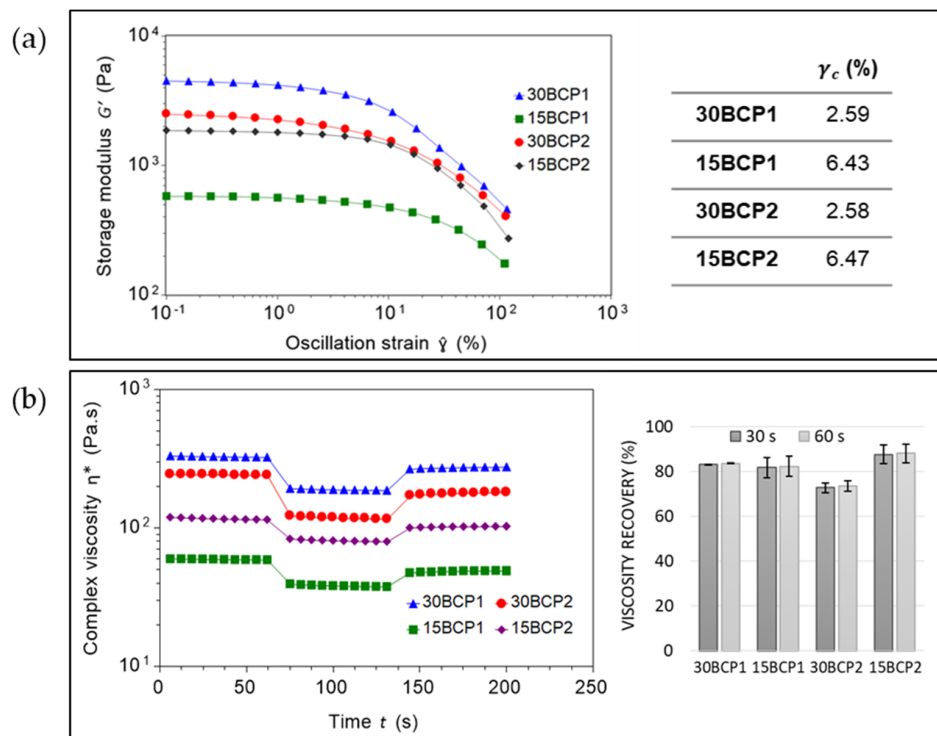


Figure 4. (a) LVR and critical strain (γ_c) of the inks. (b) Stepped Dynamic Method (SDM) and viscosity recovery (%) at room temperature.

2.4. Evaluation of Ink Stiffness and Effect of CaCl_2 Crosslinking

Crosslinking the alginate present in the compositions with CaCl_2 gives the possibility of achieving greater rigidity and malleability in the printed samples. Thus, it was necessary to evaluate the effect of the soaking time on the mechanical properties, in terms of stiffness, by oscillatory rheology [46–48]. To do so, samples of the different inks were casted into purposely designed 3D-printed molds and left to set at 4 °C to generate solid disks of material. Then, the disks were subjected to a range of deformations at a fixed frequency to determinate the elastic modulus (G'), and therefore, its stiffness (Supplementary Data, Figure S4). For all the samples, G' values increased with time of exposure to the CaCl_2 solution (Figure 5a). Inks loaded with 15 wt % BCP were initially much softer, matching with the larger water content. For the same granule size, a higher particle concentration led to greater rigidity of the ink. However, G' rises with time in a different ratio based on the particle size. The initial increase in stiffness was more noticeable in samples with 150–250 μm BCP granules (BCP2), while for the 150–500 μm granules (BCP1), the escalation was more gradual with the exposure time.

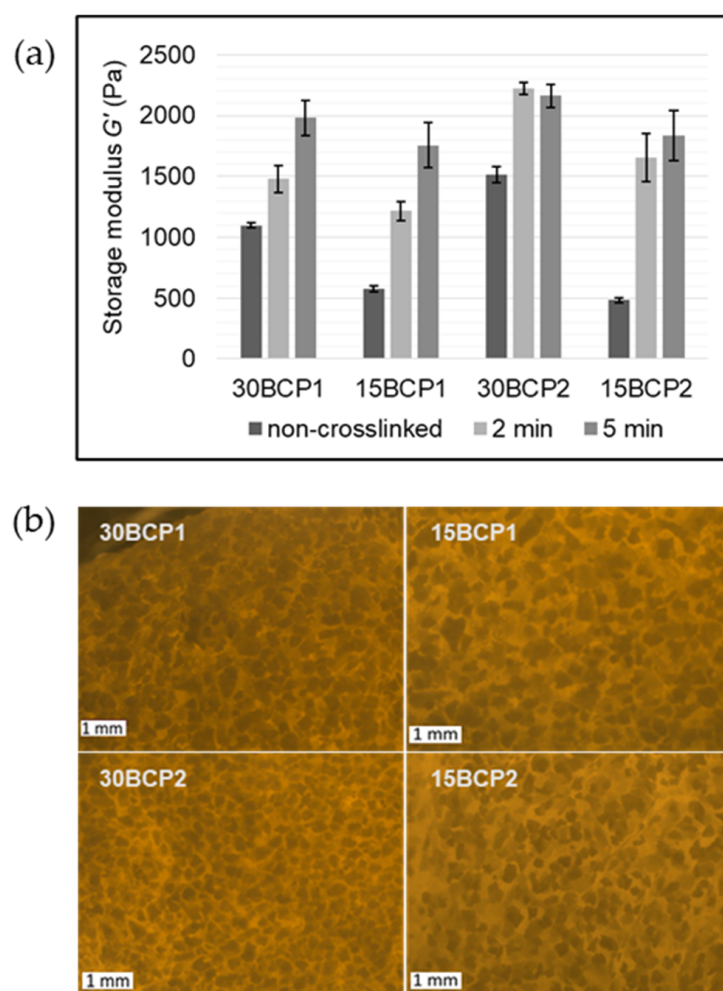


Figure 5. (a) Crosslinking effect in storage modulus (G') values at 1% strain. (b) Microscope images of ink samples cast in PLA 3D-printed molds. Scale bars are equal to 1 mm.

Microscope images of the hydrogels (Figure 5b) showed that for 30 wt % BCP inks, the smaller BCP2 particles were more packed and arranged, forming a three-dimensional network with less crosslinking time. By contrast, large particles were less compact and left larger and more irregular hydrogel gaps between them, requiring more time in contact with the calcium ions to crosslink the alginate and, in turn, taking longer to generate an

internal matrix that increases the stiffness of the measured sample. Inks with 15 wt % BCP have similar appearances irrespective of the particle size, with the particles more dispersed throughout the hydrogel and reaching similar stiffness values after soaking for 5 min in CaCl_2 solution.

2.5. Printing Settings

The printhead and print bed temperature regulation system enabled the management of the inks' thermo-responsive behavior by applying a controlled temperature in the syringe, which ensured the flowability without breaking the thermosensitive entanglement responsible for retaining the BCP suspension in the matrix (Figure 6a). Correct extrusion and deposition for 30 wt % ink (30BCP2) was achieved by setting the extruder temperature to 18 °C. Inks with higher water content (15BCP1 and 15BCP2) needed a slightly lower temperature in the printhead to extrude stable and regular filaments. As the flow curves predicted, printing with 30BCP1 was not suitable, as it caused nozzle clogging with the application of shear (extrusion) regardless of the temperature tested.

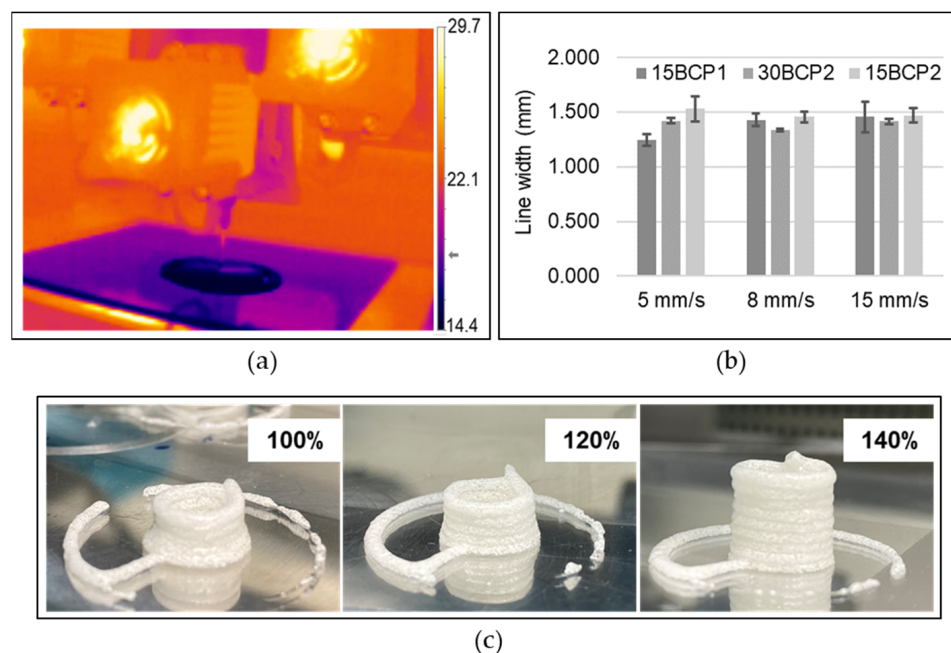


Figure 6. Printing set up. (a) Thermographic image of the temperature-induced in situ gelation of the inks. (b) Measured line width of filaments printed at 5, 8, and 15 mm/s. (c) Extrusion width calibration by printing hollow cylinders with different values of this process parameter.

To select the most suitable printing speed, a simple printing test was carried out at different velocities. A speed of 8 mm/s was established for the greater definition in the lines with less deviation (Figure 6b). The extrusion width was experimentally adjusted by printing hollow cylinders. As seen in Figure 6c, the default extrusion width value led to a figure with a cylindrical design poorly reproduced. Increasing the value of this printing parameter made the printer extrude a higher amount of material. Thus, the extruded filaments formed were thicker and generated layers whose height reached the expected height layer preset by the printer. In that way, the fluid was correctly deposited on the previous layer, and a cylinder of regular diameter was generated.

2.6. 3D-Printed Disks: Interplay between Stiffness, Ink Composition, and Printing Process Parameters

The four structures resulting from the combination of the printing parameters were executed correctly and precisely with the three printable inks (15BCP1, 30BCP2, and 15BCP2) (Figure 7). The skirts added in the configuration of the models fulfilled their

objective of ensuring the correct flow of the ink before starting to print the desired structure, thus avoiding the appearance of defects. Microscopic observation of the figures showed that the BCP particles were uniformly distributed in the extruded filaments. Once deposited, the printed lines remained fairly defined and could be clearly distinguished, especially in the case of 30BCP2. In figures with a higher infill percentage, the deposited filaments tended to come together but did not merge completely. This result is an indicator of a good recovery of the viscoelastic properties of the inks after their extrusion, which is essential to achieve a satisfactory execution of 3D models, especially those with a substantial length in the Z-axis.

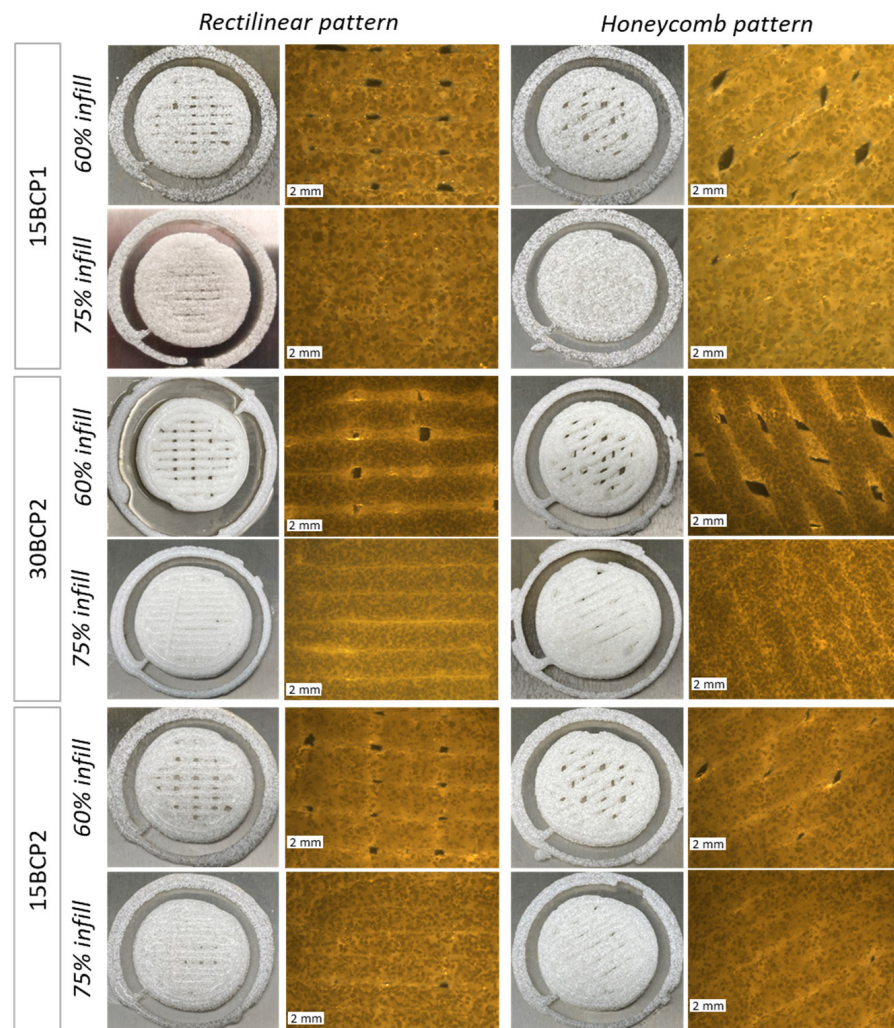


Figure 7. Photographic and microscopic images of disks printed with different parameters. Scale bars: 2 mm.

Regarding the stiffness of the matrix, by comparing the values of the elastic or storage modulus (G') at 1% strain, it was observed that the highest results detected corresponded in all cases to the 30BCP2 ink, regardless of the pattern or infill percentage set (Figure 8). Due to the higher concentration of solid particles, it was foreseeable that the matrices printed with this ink would have a higher value of elastic modulus, since the BCP granules enhance the biomechanical properties of the scaffold. Between different infill patterns, the figures with rectilinear filling yielded larger G' values. However, for the same pattern, the less filled figures had higher stiffness, since more porous structures have a greater contact surface when crosslinking with the alginate and therefore more rigidity.

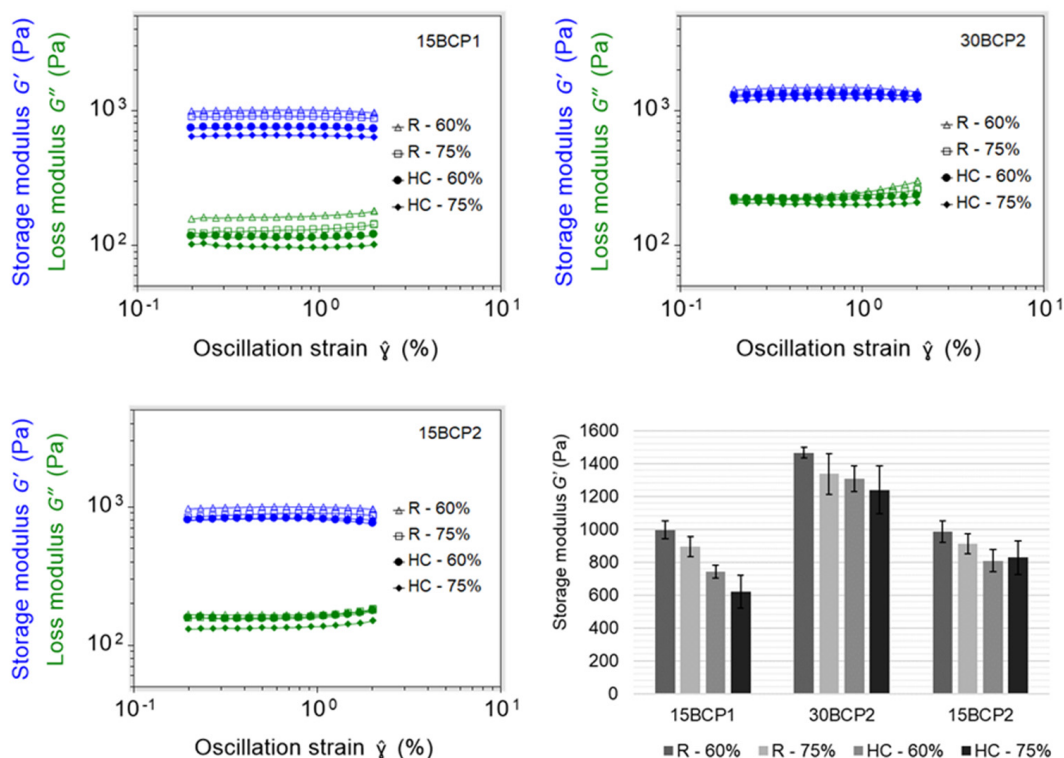


Figure 8. Amplitude sweep tests on 3D-printed figures and storage modulus detected at 1% strain for patterns rectilinear (R) and honeycomb (HC) at 60% or 75% infill.

Thus, it was evidenced that not only the ink composition but also the printing parameters greatly influence the biomechanical properties of the printed structures. Consequently, they must be taken into account and evaluated because, as other authors have already demonstrated, the function of cells residing in bone tissue could be affected by material stiffness [23,24,49].

2.7. Swelling Behavior of Printed 3D Structures

First, 10 mm-edge cubes were printed with 1 mm of layer height, a rectilinear pattern, and 60% infill (Figure 9a). The structures obtained successfully reproduced the 3D model both in its dimensions and appearance. A phalanx 3D model was also printed to evaluate the proper execution of rounded shapes and more complex structures (Figure 9b).

The swelling ratio of the printed structures, which represents the ability of the different compositions to retain and diffuse the buffer solution, and thereby mimic the constructs ability to absorb body fluid [50], was analyzed in DPBS. In contact with the calcium-free DPBS, an exchange reaction occurred between the calcium ions of the printed structure and the sodium ions in the DPBS, breaking the crosslinks in the alginate and allowing water to enter the hydrogel [51]. For fresh samples, swelling profiles differed with respect to granule size. Figure 10a depicts that in 15BCP1 cubes, the weight (and consequently their SR%) progressively increased with the passage of minutes. However, 30BCP2 and 15BCP2 cubes showed lower SR% after 3 h of soaking due to a decrease in their weight. This result was not due to the fact that less water was captured by the hydrogel but rather because the particles contained in these inks (BCP2 granules) were released from the hydrogel matrix and deposited on the bottom of the plate already from minute 60 of soaking (Supplementary Data, Figure S7). After 24 h of incubation, the SR% for 15BCP1 cubes reached 94%, while values for 30BCP2 and 15BCP2 were only 80% and 74%, respectively, because of a higher and faster particle release with regard to the 15BCP1 samples.

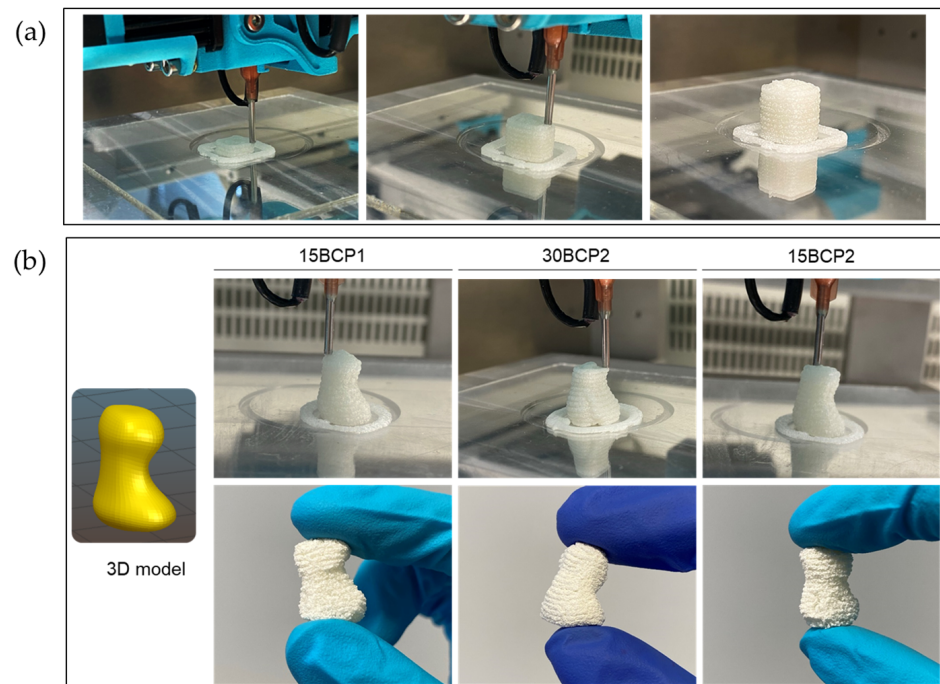


Figure 9. (a) Representative images of the printing process of cubes for swelling tests. (b) Phalanx model printed to evaluate the proper execution of rounded shapes. Dehydrated samples correctly retained their shape.

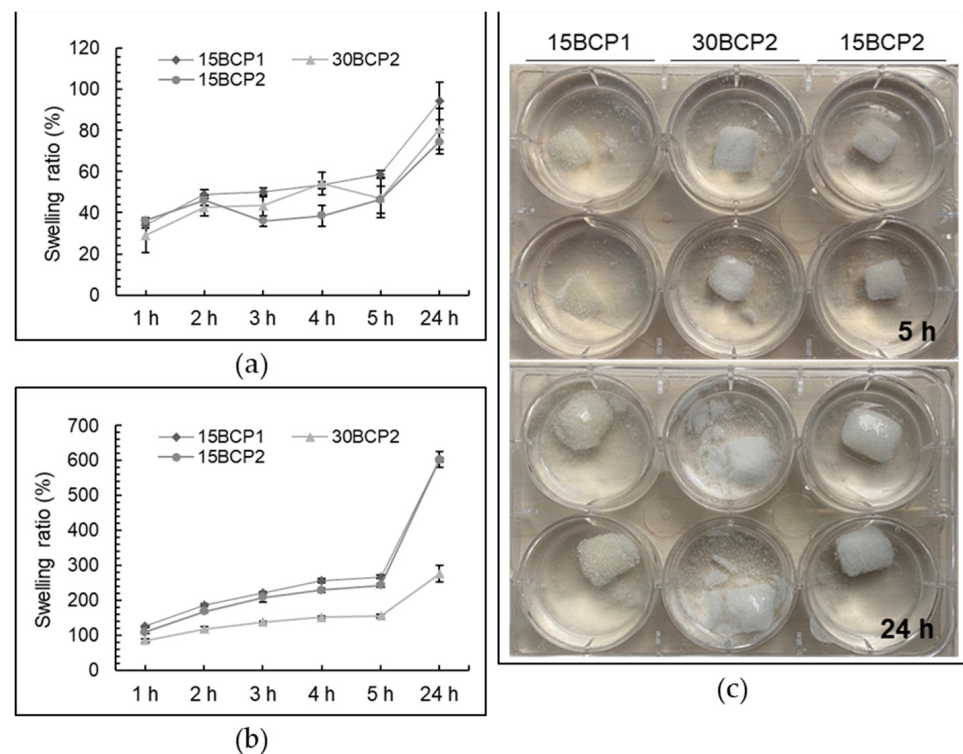


Figure 10. Swelling ratio (%) in DPBS as a function of incubation time of the (a) fresh and (b) dehydrated 3D-printed cubes fabricated from ceramic hydrogels of different compositions. (c) Optical images of the rehydrated structures after 5 h and 24 h.

Regarding the dehydrated samples, the figures printed with 15 wt % BCP hydrogels lost almost 80% of their weight during the drying process due to its higher water content (Table 2). Consequently, figure shrinkage was also greater for 15BCP1 and 15BCP2 cubes

with a reduction in the size greater than 30%. Visual appearance of dehydrated cubes can be seen in the Supplementary Data (Figure S8).

Table 2. Weight (W) and height (H) loss of dehydrated 3D-printed cubes.

	W_i (g) \pm SD	W_f (g) \pm SD	Weight lost (%) \pm SD	H_i (mm) \pm SD	H_f (mm) \pm SD	Height lost (%) \pm SD
15BCP1	1.380 \pm 0.01	0.286 \pm 0.01	79.09 \pm 0.66	101.00 \pm 1.00	69.67 \pm 0.58	31.03 \pm 0.34
30BCP2	1.484 \pm 0.06	0.522 \pm 0.02	64.36 \pm 0.76	100.33 \pm 0.58	93.67 \pm 1.15	6.00 \pm 1.49
15BCP2	1.350 \pm 0.01	0.285 \pm 0.01	78.87 \pm 0.40	101.00 \pm 1.00	68.0 \pm 0.00	32.67 \pm 0.67

Subscript letters “i” and “f” mean “initial” and “final”, respectively.

Interestingly, due to the strong hydrophilicity and swelling ability of sodium alginate and gelatin gels [52], the swelling ratio of the printed cubes increased remarkably with soaking time even after crosslinking and dehydration steps (Figure 10b). However, SR% values in time notably differed depending on the hydrogel composition: while SR% reached 600% for 15BCP1 and 15BCP2 formulations after 24 h, for 30BCP2 samples, the SR% was only 275%. As can be seen in Figure 10c, the cubes printed with 30BCP2 underwent a faster disintegration during the rehydration process. In that way, while the 15BCP1 and 15BCP2 cubes retained their shape after 24 h of soaking, the 30BCP2 samples noticeably broke down, lowering the weight of the final remaining structure and consequently reducing the SR% value. Materials with higher water absorption capacities often facilitate the wettability of the structures and subsequently enable the adhesion, proliferation, and migration of cells during the differentiation process [52]. However, this fast process of disintegration could not be suitable for cell adhesion or integration and, in this case, for lyophilized 30 wt % BCP-loaded hydrogels, stronger crosslinked matrices should be devised.

3. Conclusions

Due to the incidence and prevalence of osteoporosis and major trauma cases, the search for alternatives for bone repairing remains an object of interest. Among other options, 3D printing provides particular benefits such as the creation of on-demand implants tailored to the patient needs. In this vein, this work has investigated the generation of new ceramic biomaterial inks by combining a hydrocolloid-based hydrogel with BCP particles of sizes between 150 and 500 μ m. After a detailed evaluation of the rheological and mechanical properties, it has been determined that both the concentration and the particle size have a significant influence on the behavior of the inks. In addition, other factors such as the crosslinking time or the configuration of the printing process parameters also imply changes in the final structure achieved, acquiring different levels of stiffness and rigidity. Likewise, apart from the matrix composition, the swelling behavior is influenced by the post-processing applied to the printed structures such as drying procedures. Thereby, the combination of all these factors generates printed structures with totally tunable stiffness, swelling, or degradation, where everything can be modulated in terms of achieving a better cell adhesion and interaction, potentiating the osteoconductivity of BCP particles, and promoting bone healing.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

Sodium alginate (sodium salt of alginic acid from brown algae; CAS no. 9005-38-3) and gelatin (175 g Bloom, Type A, porcine skin, suitable for cell culture; CAS no. 9000-70-8) were obtained from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Xanthan gum (CAS no.11138-66-2) was purchased from Fagron Ibérica SAU (Terrassa, Spain). Dulbecco’s Phosphate-Buffered Salt Solution 1X, without calcium and magnesium (DPBS) (Corning™ 21-031-CV) was purchased from Fisher Scientific SL (Madrid, Spain). Commercially available biphasic calcium phosphate (BCP) bone graft (MagnetOs™ Granules; Kuros Biosciences

BV, Bilthoven, the Netherlands) was kindly provided as 150–500 μm size particles (BCP1) and 150–250 μm size particles (BCP2).

4.2. BCP-Hydrogel Preparation

Xanthan gum, sodium alginate, and gelatin mixtures were combined until obtaining a high-viscosity thermo-reversible hydrogel. Four biomaterial inks were prepared by mixing the same hydrogel with different ratios and particle sizes of BCP (Table 3). The formulations were prepared as follows. Firstly, gelatin was hydrated with deionized water and melted in a bath at 40 ± 2 °C. Meanwhile, the required amount of xanthan gum and sodium alginate powders were manually mixed with water gradually added. Once a homogeneous paste was formed, molten gelatin was slowly incorporated and gently mixed. Finally, the corresponding size and quantity of biphasic calcium phosphate granules—wetted with deionized water for an easy manipulation—were aggregated to the mix. Manual mixing was performed during the entire process and is highly recommended to avoid air incorporation into the ink. The formula was left to rest in a bath at 60 ± 2 °C for 15 min. During this time, the container was wrapped with food-grade plastic protective film to prevent water loss. Printer-compatible syringes (BD 3 mL Syringe Luer-Lok™ Tip; Benton, Dickinson and Company, Aalst, Belgium) were filled, while inks remained hot and stored in the fridge at 4 °C until use. Pictures of the formulation steps are available in the Supplementary Data (Figure S1).

Table 3. Biomaterial ink composition.

	wt %			
	30BCP1	15BCP1	30BCP2	15BCP2
Xanthan gum	3	3	3	3
Sodium alginate	2	2	2	2
Gelatin	2	2	2	2
BCP1 (150–500 μm)	30	15	-	-
BCP2 (150–250 μm)	-	-	30	15
Deionized water	63	78	63	78

4.3. Rheological Analysis and Printability Assessment

The rheological characterization of ink samples was carried out with a controlled stress rheometer (Discovery HR-2, DHR, TA Instruments, New Castle, WI, USA) equipped with a parallel plate (25 mm diameter) and a controlled convection/radiant heating oven for stable temperature control (Environmental Test Chamber, ETC, TA Instruments, New Castle, USA). The formulations were warmed up in a 30 °C water bath for 30 min before testing to form a more flowable state that would allow the ink samples to be handled without excessively damaging their internal structure and prevent air entrapment. Samples (≈ 1.5 mL) were loaded with a spatula. In every test, the mean average data of three replicates were used to plot the curves. Results were recorded and processed by Trios software (Trios Rheology Software, TA Instruments, New Castle, USA).

4.3.1. Flow Behavior

The shear-viscosity tests were conducted in flow ramp mode with the shear rate increasing from 0.01 to 100 s^{-1} within 120 s at 37 °C. Shear rheology was characterized by fitting the experimental data to the model of Herschel–Bulkley ($\tau = \tau_0 + K(\dot{\gamma})^n$), where τ_0 is the yield stress (Pa) below which there is no flow, K is the consistency index ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$), and n is the flow index that defines the degree of non-Newtonian behavior (shear thickening for $n > 1$ and shear thinning for $n < 1$) [42,53]. The three rheometric parameters were evaluated.

4.3.2. Thixotropy and Viscosity Recovery

Thixotropy was firstly measured at 37 °C and room temperature through a shear recovery test known as the Stepped Flow Method (SFM), which consisted of 3 different

steps: (1) a low shear rate of 0.4 s^{-1} for 120 s, (2) a high shear rate at 100 s^{-1} for 40 s, and finally, (3) a low shear rate of 0.4 s^{-1} for 120 s. The regeneration of the fluid's internal structure was determined as the percentage of viscosity obtained during the first 40 s and the last 120 s in the third step (after high shear rate), based on the mean average viscosity obtained in the last 40 s of the first step, where equilibrium viscosity was reached. As SFM measurements performed at room temperature resulted in poorly reproducible results, the Stepped Dynamic Method (SDM) was instead used to properly evaluate the structural regeneration at this temperature. Firstly, the linear viscoelastic interval (LVR)—and its linearity limit (γ_c)—was determined by means of amplitude sweeps in a strain interval of 0.1 to 100% and at a fixed frequency of 1 Hz. SDM tests were performed to measure complex viscosity (η^*) under low deformation (0.1% strain), high deformation (20% strain, out of the LVR of the inks to destroy the internal structure of the samples), and again under low deformation. Complex viscosity recovery was determined as the percentage of viscosity obtained during the first 30 s and the last 60 s in the third step (after high deformation) based on the mean average viscosity obtained in the last 30 s of the first step.

4.4. Effect of CaCl_2 Crosslinking on BCP-Hydrogel Matrix Stiffness

Samples of the four formulated ceramic inks were cast in custom-designed and 3D-printed molds. First, $25 \times 25 \times 5$ mm disk-shaped molds were manufactured in-house in PLA by Fused Deposition Modeling (FDM). Pictures of the printing process and the molds can be seen in the Supplementary Data (Figure S2). Once filled with the inks, the molds were covered with film to prevent water loss and stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 h. The crosslinking effect of CaCl_2 on casted samples was investigated at $23 \text{ }^\circ\text{C}$ by performing amplitude sweeps from 0.2% to 2% strain using the same rheometric equipment described in Section 4.3. Samples were measured before crosslinking and after 2 or 5 min covered in 0.5% (*w/v*) CaCl_2 solution.

4.5. 3D-Printing Settings

A stepper motor-driven syringe-based extrusion 3D printer (bIDO-I, Idonial Technological Center, Gijón, Spain) was used to print the constructs. For every assay, a selected 3D model was imported into an open-source slicing software (Slic3r), from which different versions of G-code were exported depending on the printing parameters set. Stainless steel, blunt-end dispenser tips (Fisnar, Glasgow, United Kingdom) with a 1.37 mm inner diameter (15G) were used as printer nozzles. To achieve a correct flow, the extruder temperature was set to $18 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30BCP2 and $16 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15BCP1 and 15BCP2 inks. The printing bed temperature was adjusted to $15 \text{ }^\circ\text{C}$ to ensure the complete gelation of the deposited material. A thermographic camera (Optris[®] PI 230; Optris GmbH, Berlin, Germany) allowed for the visualization of the fluid-to-solid ink transition phase. Flat glass pieces were used as a support to remove the figures easily from the printing bed, facilitate cleaning tasks, and reduce the waiting time between printing processes.

4.5.1. Printing Speed Selection

To select a suitable printing speed, simple squares were printed in triplicate at three different speeds (5 mm/s, 8 mm/s, and 15 mm/s). The uniformity and thickness of the printed struts were measured underneath the microscope to assess the most appropriate velocity.

4.5.2. Extrusion Width Calibration

The extrusion width is the thickness of a single filament extruded either in free air or above a surface. Adjusting this printing parameter can improve the performance of the printing process and thus obtain far more satisfactory results. For that purpose, a hollow cylinder was printed while increasing the extrusion width value until the figure was properly executed.

4.6. Stiffness of Figures with Different Structural Configurations

The relative stiffness of 3D-printed disks ($25 \times 25 \times 2$ mm) resulting from the combination of each BCP-hydrogel with two main printing parameters (infill density and infill pattern) was assessed.

4.6.1. 3D Model Setup

By combining two infill patterns (rectilinear and honeycomb) with two infill densities (60% and 75%), four different structures (Figure 11) were configured to be tested with printable inks (15BCP1, 30BCP2, and 15BCP2). A double skirt was added to establish continuous ink flow before figure printing.

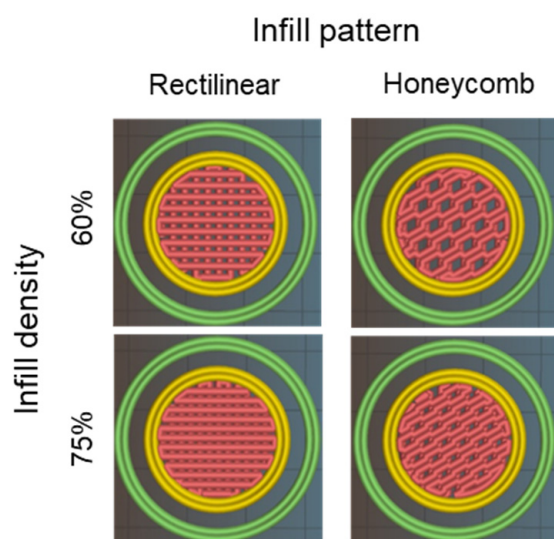


Figure 11. Slic3r software preview of disk-shaped 3D model with different printing process parameters configured.

4.6.2. Stiffness Measurement of the Printed Figures

The stiffness of the printed matrices was measured by performing amplitude sweeps from 0.2% to 2% strain, similarly to Section 4.4. Samples were soaked in a 0.5% (*w/v*) CaCl_2 solution for 2 min and then washed twice with deionized water before the test.

4.7. Swelling Degree of Fresh and Dehydrated 3D-Printed Cubes

Six cubes ($10 \times 10 \times 10$ mm) were printed with each of the ceramic-ink formulations (15BCP1, 30BCP2 and 15BCP2); then, they were crosslinked for 2 min and washed twice with deionized water. Samples were divided in two groups for subsequent tests. The swelling ratio (SR%) of BCP hydrogels was calculated as follows:

$$SR\% = \frac{(W_f - W_i)}{W_i} \times 100$$

where W_i and W_f represent the sample weights before and after water absorption, respectively. Freshly crosslinked cubes ($n = 9$) were immediately immersed in a large volume of DPBS at pH 7.4 and room temperature. Then, the figures were weighed at predetermined time intervals: 1, 2, 3, 4, 5, and 24 h. The remaining cubes ($n = 9$) were allowed to dry at room temperature and weighed until a stable weight was determined. Figure dimensions were also surveyed to evaluate structure shrinkage resulting from the dehydration process. Then, the rehydration process and SR% determination were performed by soaking the dehydrated cubes in DPBS and weighing them at the same predetermined time intervals mentioned before.

4.8. Microscopy

BCP raw granules and 3D-printed structures were imaged using a stereo light microscope Leica M205A equipped with a DFC295 camera (Leica Microsystems Ltd., Wetzlar, Germany).

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/gels8010028/s1>. Figure S1: (A) XG and SA mixture with deionized water. (B) Incorporation of GA to the previous mixture. (C) Wetted BCP particles. (D) Final ink with BCP included. (E). Stable and homogenous biomaterial–ink loaded in printer-compatible syringe. Figure S2: (A). FDM printing of the molds. (B). Final mold detail. (C). Sample casted and protected with film, ready to be stored at 4 °C. Figure S3: Flow curves. Figure S4: Amplitude sweeps for stiffness determination of samples non-crosslinked (A) and after 2 min (B) or 5 min (C). Figure S5: Printed disk simple placed between rheometer plates for stiffness test. Figure S6: Fresh printed cubes. Figure S7: Swelling behavior of fresh printed cubes. Higher particle release for 150–250 µm inks (30BCP2 and 15BCP2) can be seen from min 60. Figure S8: Visual appearance of dehydrated cubes. Shrinkage is notably higher in 15BCP1 and 15BCP2 samples due to its larger water content in both formulas with regard to 30BCP2. Table S1: Line width at different printing speeds tested. Table S2: Weight and height of dehydrated 3D-printed cubes. Video S1: Extrusion width calibration, Video S2: Disk printing process.

Author Contributions: Conceptualization, H.H.-M.; methodology, H.H.-M. and D.R.-G.; validation, H.H.-M.; investigation, H.H.-M. and D.R.-G.; resources, N.W.K. and F.B.-d.G.; writing—original draft preparation, H.H.-M.; writing—review and editing, H.H.-M., N.W.K. and E.A.; visualization, H.H.-M.; supervision, E.A.; project administration, H.H.-M., M.A.F. and F.B.-d.G.; funding acquisition, M.A.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by European Union’s Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No 874790 (cmRNAbone project).

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest: Nathan Kucko and Florence Barrère-de Groot are employees of Kuros Biosciences BV. All authors declare no conflict of interest and no benefit of any kind was received either directly or indirectly.

References

- Daly, A.C.; Pitacco, P.; Nulty, J.; Cunniffe, G.M.; Kelly, D.J. 3D printed microchannel networks to direct vascularisation during endochondral bone repair. *Biomaterials* **2018**, *162*, 34–46. [\[CrossRef\]](#)
- Sun, H.; Hu, C.; Zhou, C.; Wu, L.; Sun, J.; Zhou, X.; Xing, F.; Long, C.; Kong, Q.; Liang, J.; et al. 3D printing of calcium phosphate scaffolds with controlled release of antibacterial functions for jaw bone repair. *Mater. Des.* **2020**, *189*, 108540. [\[CrossRef\]](#)
- Wu, Y.; Woodbine, L.; Carr, A.M.; Pillai, A.R.; Nokhodchi, A.; Maniruzzaman, M. 3D Printed Calcium Phosphate Cement (CPC) Scaffolds for Anti-Cancer Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1077. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Van Dijk, L.; de Groot, F.; Yuan, H.; Champion, C.; Patel, A.; Poelstra, K.; de Bruijn, J. From benchtop to clinic: A translational analysis of the immune response to submicron topography and its relevance to bone healing. *Eur. Cells Mater.* **2021**, *41*, 756–773. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Systematic Review Centre Benefits and associated risks of using allograft, autograft and synthetic bone fusion material for patients and service providers—A Systematic Review. *JBI Libr. Syst. Rev.* **2010**, *8*, 303–327.
- Valtanen, R.S.; Yang, Y.P.; Gurtner, G.C.; Maloney, W.J.; Lowenberg, D.W. Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future? *Injury* **2021**, *52*, S72–S77. [\[CrossRef\]](#)
- Li, N.; Guo, R.; Zhang, Z.J. Bioink Formulations for Bone Tissue Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 44. [\[CrossRef\]](#)
- Ratheesh, G.; Vaquette, C.; Xiao, Y. Patient-Specific Bone Particles Bioprinting for Bone Tissue Engineering. *Adv. Healthc. Mater.* **2020**, *9*, 2001323. [\[CrossRef\]](#)
- Chimene, D.; Miller, L.; Cross, L.M.; Jaiswal, M.K.; Singh, I.; Gaharwar, A.K. Nanoengineered Osteoinductive Bioink for 3D Bioprinting Bone Tissue. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 15976–15988. [\[CrossRef\]](#)
- Ahlfeld, T.; Cubo-Mateo, N.; Cometta, S.; Guduric, V.; Vater, C.; Bernhardt, A.; Akkineni, A.R.; Lode, A.; Gelinsky, M. A Novel Plasma-Based Bioink Stimulates Cell Proliferation and Differentiation in Bioprinted, Mineralized Constructs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 12557–12572. [\[CrossRef\]](#)
- Akkineni, A.R.; Luo, Y.; Schumacher, M.; Nies, B.; Lode, A.; Gelinsky, M. 3D plotting of growth factor loaded calcium phosphate cement scaffolds. *Acta Biomater.* **2015**, *27*, 264–274. [\[CrossRef\]](#)

12. Shao, H.; He, J.; Lin, T.; Zhang, Z.; Zhang, Y.; Liu, S. 3D gel-printing of hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 1163–1170. [[CrossRef](#)]
13. Lin, K.-F.; He, S.; Song, Y.; Wang, C.-M.; Gao, Y.; Li, J.-Q.; Tang, P.; Wang, Z.; Bi, L.; Pei, G.-X. Low-Temperature Additive Manufacturing of Biomimic Three-Dimensional Hydroxyapatite/Collagen Scaffolds for Bone Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 6905–6916. [[CrossRef](#)]
14. Kim, D.; Lee, J.; Kim, G. Biomimetic gelatin/HA biocomposites with effective elastic properties and 3D-structural flexibility using a 3D-printing process. *Addit. Manuf.* **2020**, *36*, 101616. [[CrossRef](#)]
15. Yue, S.; He, H.; Li, B.; Hou, T. Hydrogel as a Biomaterial for Bone Tissue Engineering: A Review. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1511. [[CrossRef](#)]
16. Zhang, J.; Barbieri, D.; ten Hoopen, H.; de Bruijn, J.D.; van Blitterswijk, C.A.; Yuan, H. Microporous calcium phosphate ceramics driving osteogenesis through surface architecture. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2015**, *103*, 1188–1199. [[CrossRef](#)]
17. Duan, R.; van Dijk, L.; Barbieri, D.; de Groot, F.; Yuan, H.; de Bruijn, J. Accelerated bone formation by biphasic calcium phosphate with a novel sub-micron surface topography. *Eur. Cells Mater.* **2019**, *37*, 60–73. [[CrossRef](#)]
18. Vu, A.A.; Burke, D.A.; Bandyopadhyay, A.; Bose, S. Effects of surface area and topography on 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone grafting applications. *Addit. Manuf.* **2021**, *39*, 101870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Azam, S.M.R.; Zhang, M.; Mujumdar, A.S.; Yang, C. Study on 3D printing of orange concentrate and material characteristics. *J. Food Process Eng.* **2018**, *41*, e12689. [[CrossRef](#)]
20. Herrada-Manchón, H.; Rodríguez-González, D.; Alejandro Fernández, M.; Suñé-Pou, M.; Pérez-Lozano, P.; García-Montoya, E.; Aguilar, E. 3D printed gummies: Personalized drug dosage in a safe and appealing way. *Int. J. Pharm.* **2020**, *587*, 119687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Li, H.; Liu, S.; Lin, L. Rheological study on 3D printability of alginate hydrogel and effect of graphene oxide. *Int. J. Bioprinting* **2016**, *2*, 10–12. [[CrossRef](#)]
22. Liu, Z.; Bhandari, B.; Prakash, S.; Mantihal, S.; Zhang, M. Linking rheology and printability of a multicomponent gel system of carrageenan-xanthan-starch in extrusion based additive manufacturing. *Food Hydrocoll.* **2019**, *87*, 413–424. [[CrossRef](#)]
23. Zhang, T.; Lin, S.; Shao, X.; Zhang, Q.; Xue, C.; Zhang, S.; Lin, Y.; Zhu, B.; Cai, X. Effect of matrix stiffness on osteoblast functionalization. *Cell Prolif.* **2017**, *50*, e12338. [[CrossRef](#)]
24. Yao, D.; Qiao, F.; Song, C.; Lv, Y. Matrix stiffness regulates bone repair by modulating 12-lipoxygenase-mediated early inflammation. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *128*, 112359. [[CrossRef](#)]
25. Wu, Y.; Lin, Z.Y.W.; Wenger, A.C.; Tam, K.C.; Tang, X.S. 3D bioprinting of liver-mimetic construct with alginate/cellulose nanocrystal hybrid bioink. *Bioprinting* **2018**, *9*, 1–6. [[CrossRef](#)]
26. Guo, Z.; Xia, J.; Mi, S.; Sun, W. Mussel-Inspired Naturally Derived Double-Network Hydrogels and Their Application in 3D Printing: From Soft, Injectable Bioadhesives to Mechanically Strong Hydrogels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 1798–1808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lee, K.Y.; Mooney, D.J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 106–126. [[CrossRef](#)]
28. Wang, C.-S.; Natale, G.; Virgilio, N.; Heuzey, M.-C. Synergistic gelation of gelatin B with xanthan gum. *Food Hydrocoll.* **2016**, *60*, 374–383. [[CrossRef](#)]
29. Saha, D.; Bhattacharya, S. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. *J. Food Sci. Technol.* **2010**, *47*, 587–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Campiglio, C.E.; Contessi Negrini, N.; Farè, S.; Draghi, L. Cross-Linking Strategies for Electrospun Gelatin Scaffolds. *Materials* **2019**, *12*, 2476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Talebian, S.; Mehrali, M.; Taebnia, N.; Pennisi, C.P.; Kadumudi, F.B.; Foroughi, J.; Hasany, M.; Nikkhah, M.; Akbari, M.; Orive, G.; et al. Self-Healing Hydrogels: The Next Paradigm Shift in Tissue Engineering? *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1801664. [[CrossRef](#)]
32. Herrada-Manchón, H.; Celada, L.; Rodríguez-González, D.; Alejandro Fernández, M.; Aguilar, E.; Chiara, M.-D. Three-dimensional bioprinted cancer models: A powerful platform for investigating tunneling nanotube-like cell structures in complex microenvironments. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *128*, 112357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hadjsadok, A.; Moulai-Mostefa, N.; Rebiha, M. Rheological Properties and Phase Separation of Xanthan-Sodium Caseinate Mixtures Analyzed by a Response Surface Method. *Int. J. Food Prop.* **2010**, *13*, 369–380. [[CrossRef](#)]
34. Petri, D.F.S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*. [[CrossRef](#)]
35. Rodd, A.B.; Dunstan, D.E.; Boger, D.V. Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *42*, 159–174. [[CrossRef](#)]
36. Kumar, A.; Rao, K.M.; Han, S.S. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *180*, 128–144. [[CrossRef](#)]
37. Bombaldi de Souza, R.F.; Bombaldi de Souza, F.C.; Thorpe, A.; Mantovani, D.; Popat, K.C.; Moraes, Â.M. Phosphorylation of chitosan to improve osteoinduction of chitosan/xanthan-based scaffolds for periosteal tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *143*, 619–632. [[CrossRef](#)]
38. Izawa, H.; Nishino, S.; Maeda, H.; Morita, K.; Ifuku, S.; Morimoto, M.; Saimoto, H.; Kadokawa, J. Mineralization of hydroxyapatite upon a unique xanthan gum hydrogel by an alternate soaking process. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *102*, 846–851. [[CrossRef](#)]

39. Dyondi, D.; Webster, T.J.; Banerjee, R. A nanoparticulate injectable hydrogel as a tissue engineering scaffold for multiple growth factor delivery for bone regeneration. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 47–59. [[CrossRef](#)]
40. Freyer, J.P.; Fillak, D.; Jett, J.H. Use of xantham gum to suspend large particles during flow cytometric analysis and sorting. *Cytometry* **1989**, *10*, 803–806. [[CrossRef](#)]
41. Sarker, D. Strange but true: The physics of glass, gels and jellies is all related through rheology. *Sch. Sci. Rev.* **2017**, *99*, 102–113.
42. Mueller, S.; Llewellyn, E.W.; Mader, H.M. The rheology of suspensions of solid particles. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, *466*, 1201–1228. [[CrossRef](#)]
43. Mewis, J.; Wagner, N.J. *Colloidal Suspension Rheology*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2011; ISBN 978051197.
44. Han, D.; Kim, J.H.; Lee, J.H.; Kang, S.-T. Critical Grain Size of Fine Aggregates in the View of the Rheology of Mortar. *Int. J. Concr. Struct. Mater.* **2017**, *11*, 627–635. [[CrossRef](#)]
45. Kreimendahl, F.; Köpf, M.; Thiebes, A.L.; Duarte Campos, D.F.; Blaeser, A.; Schmitz-Rode, T.; Apel, C.; Jockenhoevel, S.; Fischer, H. Three-Dimensional Printing and Angiogenesis: Tailored Agarose-Type I Collagen Blends Comprise Three-Dimensional Printability and Angiogenesis Potential for Tissue-Engineered Substitutes. *Tissue Eng. Part C Methods* **2017**, *23*, 604–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zuidema, J.M.; Rivet, C.J.; Gilbert, R.J.; Morrison, F.A. A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2014**, *102*, 1063–1073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Yan, C.; Pochan, D.J. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Cox, T.; Madsen, C. Relative Stiffness Measurements of Cell-embedded Hydrogels by Shear Rheology in vitro. *Bio-Protocol* **2017**, *7*, e2101. [[CrossRef](#)]
49. Zhang, J.; Wehrle, E.; Adamek, P.; Paul, G.R.; Qin, X.-H.; Rubert, M.; Müller, R. Optimization of mechanical stiffness and cell density of 3D bioprinted cell-laden scaffolds improves extracellular matrix mineralization and cellular organization for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **2020**, *114*, 307–322. [[CrossRef](#)]
50. Sarker, B.; Papageorgiou, D.G.; Silva, R.; Zehnder, T.; Gul-E-Noor, F.; Bertmer, M.; Kaschta, J.; Chrissafis, K.; Detsch, R.; Boccaccini, A.R. Fabrication of alginate–gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 1470. [[CrossRef](#)]
51. Naghieh, S.; Sarker, M.D.; Abelseth, E.; Chen, X. Indirect 3D bioprinting and characterization of alginate scaffolds for potential nerve tissue engineering applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2019**, *93*, 183–193. [[CrossRef](#)]
52. Kankala, R.; Lu, F.-J.; Liu, C.-G.; Zhang, S.-S.; Chen, A.-Z.; Wang, S.-B. Effect of Icarin on Engineered 3D-Printed Porous Scaffolds for Cartilage Repair. *Materials* **2018**, *11*, 1390. [[CrossRef](#)]
53. Schwab, A.; Levato, R.; D’Este, M.; Piluso, S.; Eglin, D.; Malda, J. Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 11028–11055. [[CrossRef](#)]

