

UNIVERSIDAD NACIONAL
Campus Omar Dengo
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA

Proyecto de graduación en la modalidad de pasantía sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Química, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química Industrial

“DESARROLLO DE UNA BIOTINTA REFORZADA CON MATERIAL LIGNOCELULÓSICO CON POTENCIAL USO EN MEDICINA REGENERATIVA”

A desarrollarse en la modalidad de pasantía

Bach. Isabel Natalia Carvajal Johnson

Tutor(a)

M.Sc. Marianelly Esquivel Alfaro

Asesores

Dr. Rafael Vindas Bolaños

M.Sc. Luis David Badilla Oviedo

Heredia, Costa Rica

Enero 2025

“Este trabajo de graduación fue _____ por el Tribunal Examinador de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Química Industrial”

Miembros del Tribunal Examinador del Trabajo Final de Graduación

	<u>NOMBRE</u>	<u>FIRMA</u>
Decano(a)	_____	_____
Director(a) de la Escuela	_____	_____
Tutor	_____	_____
Asesor	_____	_____
Lector	_____	_____
Proponente	_____	_____

RESUMEN

En los años recientes, se han incrementado los estudios en el uso de nanomateriales en técnicas especializadas de bioimpresión 3D para diversas aplicaciones biomédicas como la medicina regenerativa, la regeneración de tejidos, etc. Se ha detallado el uso de diversos tipos de nanocelulosa para la aplicación en bioimpresión 3D debido a su biocompatibilidad, propiedades mecánicas y reológicas. La mayoría de estudios en bioimpresión 3D detallan el uso de nanofibras obtenidas de manera comercial o producidas de distintos tipos de madera. Sin embargo, existen otras fuentes emergentes de nanofibras y nanocristales de celulosa como residuos agrícolas de banano, piña, maíz, entre otros que podrían ser utilizadas como fuentes de nanocelulosa para aplicación en bioimpresión 3D. Por lo tanto, en este trabajo se busca estudiar el potencial uso del rastrojo de piña como fuente de nanofibras de celulosa para su posterior uso en bioimpresión 3D.

El rastrojo de piña se compone por el tallo y las hojas, las cuales se caracterizan por ser altamente fibrosas con un contenido principal de celulosa, lignina y hemicelulosa. Este material es comúnmente llamado PALF (Pineapple Leaf Fiber, por sus siglas en inglés) y se compone mayoritariamente de celulosa. Debido a las propiedades físicas y químicas de la celulosa del PALF, se ha demostrado un potencial de aprovechamiento de este residuo al poderse obtener materiales de interés como las nanofibras (CNF). En este trabajo se utilizó PALF como materia prima para la extracción y caracterización de CNF para su posterior evaluación como potencial biomaterial en la bioimpresión 3D.

Se lograron obtener CNF blanqueada de residuo de PALF a partir de un pretratamiento oxidativo mediado por reactivo TEMPO y una degradación mecánica a alta presión, a las cuales se estudiaron sus características físicas y químicas para demostrar la remoción adecuada de lignina, extraíbles y demás componentes de la PALF. Posteriormente, se formó un hidrogel en suspensión acuosa con alcohol polivinílico (PVA) a dos distintas concentraciones y se estudiaron sus propiedades reológicas, las cuales demostraron un comportamiento adecuado para su extrusión en la impresión 3D. Los hidrogeles formados fueron estudiados en una bioimpresora 3D, donde se logró imprimir estructuras variadas a distintas presiones y velocidades de impresión. El hinchamiento, comportamiento de degradación y porosidad demostraron su potencial para uso en aplicaciones como regeneración de tejidos, medicina regenerativa y demás. Se realizaron pruebas de

biocompatibilidad *in vitro* de acuerdo a la norma ISO 10993-5, donde se demostró una alta viabilidad y crecimiento celular de células fibroblastos en las estructuras impresas de CNF obtenida de PALF y PVA.

RECONOCIMIENTOS

Al Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Polímeros de la Universidad Nacional (POLIUNA) por facilitarme los equipos, reactivos, instalaciones y apoyo constante durante el proceso de realización de la pasantía, a la University of British Columbia (UBC), el Bioproducts Institute (BPI) y el grupo de investigación de Biobased Colloids and Materials (BiCMat) por facilitarme equipos, reactivos, instalaciones y guía durante el tiempo de pasantía en Canadá. Además, agradezco el apoyo del Laboratorio de Medicina Regenerativa Traslacional de la Escuela de Veterinaria, del Hospital de Equinos y Especies Mayores, del Laboratorio y Espacio Maker de Física Aplicada del Departamento de Física y de la Universidad de Guadalajara (UDG), por prestarme sus instalaciones, reactivos y apoyo durante el desarrollo del Trabajo Final de Graduación (TFG). Les extiendo mis agradecimientos también al Centro Nacional de Biotecnología (CENIBIOT) por aportar sus instalaciones, reactivos y conocimiento para el desarrollo de mi TFG.

Además, es importante resaltar el apoyo de fondo de beca proporcionado por el gobierno de Canadá mediante el programa GoGlobal y la Universidad Nacional, que me permitió realizar la pasantía en UBC.

DEDICATORIA

En especial, me gustaría mencionar y resaltar el apoyo incondicional de mi pareja de vida Wagner Hernández López, que amo infinitamente y sin su apoyo no hubiera podido lograr cumplir los objetivos de mi Trabajo Final de Graduación. Me inspiras cada día a aspirar a mis sueños y a ser cada día una mejor persona. Me gustaría mencionar también a mis papás Manuel Carvajal Chaves y Xinia María Johnson Ramírez y mi hermano Manuel Carvajal Johnson, a quienes agradezco su apoyo durante este proceso. Este trabajo va dedicado a ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos mis seres queridos por apoyarme durante este proceso de licenciatura. Agradezco a mis compañeros, profesores y profesoras, mis mejores amigas y mi familia que compartieron su sabiduría conmigo.

Quiero mencionar a la Universidad Nacional y en especial al Laboratorio de Polímeros, quienes por sus sistemas de becas siempre me han apoyado para poder realizar pasantías en el extranjero y buscar el crecimiento académico.

A mi tutora Marianelly Esquivel Alfaro, quien siempre me ha apoyado durante mis 6 años de carrera y sin ella no hubiera llegado aquí. Gracias por su guía y apoyo incondicional, más que profesora ha sido como una mentora profesional y personal. Gracias a Luis Badilla Oviedo por su guía durante mi proceso de licenciatura y su apoyo para sacar los objetivos de mi tesis. En especial, gracias al Dr. Rafael Vindas y el Hospital de Especies Mayores por ayudarme a cumplir mi sueño de trabajar en el campo de la biomedicina, la medicina regenerativa y la medicina veterinaria. Además, mi agradecimiento a la Dra. Belkis Sulbarán, quien me apoyo en conjunto a Marianelly para realizar mi trabajo de TFG.

Gracias infinitas al Dr. Orlando Rojas, por recibirme en su grupo de investigación y por guiarme durante mi proceso de pasantía. Agradezco también a mis amigos y compañeros en UBC: Julia Azzi, Matheus Oliveira Barros, Juan Pablo Calvo, Jingqian Chen, Yi Lu, Ran Bi, entre otros.

Mis agradecimientos más profundos a Ariana Gómez y los demás estudiantes asistentes del POLIUNA. Ustedes son un grandísimo apoyo para el funcionamiento de la investigación y han sido una gran parte de mi TFG.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIACIONES.....	12
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	13
1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	13
2.1 PIÑA	14
2.1.1 <i>Cultivo de piña en Costa Rica</i>	14
2.1.2 <i>Celulosa</i>	15
2.1.3 <i>Nanofibras de celulosa provenientes de residuos vegetales</i>	16
2.2 IMPRESIÓN 3D Y FABRICACIÓN ADITIVA.....	17
2.3 BIOPOLÍMEROS COMO COMPONENTES DE BIOTINTAS DE IMPRESIÓN 3D	18
2.3.3 <i>Parámetros reológicos relacionados a la bioimpresión 3D</i>	21
2.3.4 <i>La bioimpresión 3D y la medicina regenerativa</i>	23
CAPÍTULO III: OBJETIVOS	25
3.1 HIPÓTESIS.....	25
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	25
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA	27
4.1 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOFIBRAS DE CELULOSA (CNF)	27
4.1.1 <i>Reactivos químicos</i>	27
4.1.2 <i>Caracterización de la composición química del material de partida</i>	27
4.1.3 <i>Desestructuración de las hojas del rastrojo de piña orgánica para la obtención de PALF y fibras de celulosa</i>	27
4.1.4 <i>Obtención y desintegración de las nanofibras de celulosa (CNF)</i>	27
4.1.5 <i>Caracterización de las nanofibras de celulosa (CNF)</i>	28
4.1.5.1 <i>Determinación del contenido de carboxilatos</i>	28
4.1.5.2 <i>Determinación de la carga superficial y tamaños de las nanofibras de celulosa (CNF)</i>	28
4.1.5.3 <i>Determinación de la morfología y dimensiones de las nanofibras de celulosa (CNF)</i>	29
4.1.5.4 <i>Determinación del espectro de absorción infrarroja de las nanofibras de celulosa (CNF)</i>	30
4.1.5.5 <i>Análisis de la estabilidad térmica de las nanofibras de celulosa (CNF)</i>	30
4.2 FORMULACIÓN DE LA BIOTINTA CON NANOFIBRAS DE CELULOSA DE PIÑA	30
4.2.1 <i>Desarrollo de la biotinta de nanofibras de celulosa de piña y alcohol polivinílico</i>	30
4.2.2 <i>Caracterización de las biotintas desarrolladas</i>	31
4.2.2.1 <i>Estudio de la reología de las biotintas</i>	31
4.3 IMPRESIÓN 3D DE LAS BIOTINTAS	31
4.3.1 <i>Extrusión del material de biotinta desarrollado</i>	31
4.3.2 <i>Caracterización de las estructuras impresas</i>	31
4.3.2.1 <i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	31
4.3.2.2 <i>Hinchamiento de las estructuras impresas</i>	32
4.3.2.3 <i>Estudio de degradación</i>	32
4.3.2.4 <i>Ensayo de citotoxicidad de las estructuras impresas CNF:PVA con MTS</i>	32
4.3.2.5 <i>Ensayo de proliferación celular de las estructuras impresas CNF:PVA</i>	33
4.3.2.6 <i>Ensayo de adhesión celular de las estructuras impresas CNF:PVA</i>	34

CAPITULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1 CARACTERIZACIÓN DEL RASTROJO DE PIÑA ORGÁNICO	35
5.2 OBTENCIÓN DE LAS NANOFIBRAS DE CELULOSA DE RASTROJO DE PIÑA	36
5.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOFIBRAS DE CELULOSA	37
5.3.1 Espectroscopia infrarroja por transformada Fourier (FTIR)	37
5.3.2 Determinación del zeta-potencial y tamaño de nanofibras de celulosa	38
5.3.4 Determinación de las propiedades térmicas de las nanofibras de celulosa por análisis termogravimétrico (TGA)	45
5.4 CREACIÓN DE LA BIOTINTA DE NANOFIBRAS DE CELULOSA DE RASTROJO DE PIÑA Y ALCOHOL POLIVINÍLICO	47
5.4.1 Estudio reológico de las biotintas para impresión 3D de CNF:PVA	47
5.4.2 Impresión 3D de las biotintas de impresión 3D	51
5.5 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOTINTA DE NANOFIBRAS DE CELULOSA DE RASTROJO DE PIÑA Y ALCOHOL POLIVINÍLICO	56
5.5.1 Estudio de degradación de las biotintas impresas de CNF:PVA	56
5.5.2 Estudio de hinchamiento de las biotintas impresas de CNF:PVA	57
5.5.3 Evaluación de las porosidad mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	58
5.5.4 Evaluación de la citotoxicidad de las estructuras impresas de CNF:PVA	59
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.....	66
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES.....	67
CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS.....	68
CAPÍTULO IX: ANEXOS.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación general de la jerarquía estructural de las fibras de celulosa ²²	15
Figura 2. Representación general de la jerarquía estructural de las fibras de celulosa ²²	21
Figura 3. Pasos críticos durante el proceso de extrusión de un material afectados por la reología del hidrogel ⁸²	22
Figura 4. Representación de una placa de 96 pocillos empleada para el ensayo de citotoxicidad por extracción. Doxo: Control negativo (Doxo 20 μ M), UT: Control positivo (DMEM al 10% FBS y 1% S/P), M: Concentraciones de extractos de membrana. (Elaboración Propia).....	33
Figura 5. Proceso de Obtención de las nanofibras de celulosa oxidadas con TEMPO (CNF) a partir del rastrojo de piña orgánica (Elaboración Propia).....	36
Figura 6. Espectro Infrarrojo (FTIR) de los materiales celulósicos: PALF, Celulosa NB (No Blanqueada), Celulosa B (Blanqueada) y CNF.....	37
Figura 7. Gráfico de distribución de tamaño de las nanofibras de celulosa medidas en el analizador de tamaño de partículas por difracción láser (SLS).....	40
Figura 8. Imágenes AFM para la determinación de la morfología de la CNF de piña: (a y b) Imágenes AFM.....	41
Figura 9. Imágenes TEM de las nanofibras de celulosa.....	42
Figura 10. Termogramas y derivatogramas de: la PALF, la celulosa sin blanquear (Celulosa SB), la celulosa blanqueada (Celulosa B) y la CNF.....	45
Figura 11. Gráficos de estudio reológico de las muestras CNF:PVA: (a) el comportamiento viscoso en función de la velocidad de cizallamiento, (b) el comportamiento viscoelástico en función de deformación en cizalla, (c) el comportamiento viscoelástico en función de la frecuencia angular y (d) el comportamiento viscoelástico en función del esfuerzo cortante.....	48
Figura 12. Imágenes de la impresión 3D de figuras complejas: el logo de la Universidad Nacional de Costa Rica y una oreja humana impresas en la bioimpresora con la formulación CNF:PVA 1:1.....	55
Figura 13. Determinación del promedio del porcentaje de hinchamiento de las estructuras impresas de CNF:PVA 1:1.....	57
Figura 14. Imágenes SEM de las estructuras impresas de CNF:PVA de formulación a)2:1, b)1:1 y la distribución media de los diámetros de poro c)2:1 y d)1:1.....	58
Figura 15. Efecto de los lixiviados de 4 lotes de las estructuras impresas de CNF:PVA 1:1 sobre la viabilidad celular de las células NIH/3T3 24 horas posterior a su exposición. Los resultados fueron normalizados con el grupo control. DMEM: Ctrl positivo (células+medio), Doxo: Ctrl negativo (doxorubicina).....	60
Figura 16. Imágenes de microscopía óptica del crecimiento celular de las células 3T3 24 horas posterior a su exposición en los lixiviados de las estructuras impresas de	

CNF:PVA.UT: Ctrl positivo (células-medio), Doxo: Ctrl negativo (doxorubicina), M ₁₀₀ : lixiviados de membrana de CNF:PVA al 100%, M ₈₀ : lixiviados de membrana de CNF:PVA al 80%, M ₆₀ : lixiviados de membrana de CNF:PVA al 60% , M ₄₀ : lixiviados de membrana de CNF:PVA al 40% , M ₂₀ : lixiviados de membrana de CNF:PVA al 20%.....	61
Figura 17. Titulación conductimétrica de la CNF con hidróxido de sodio 0,04 M.....	78
Figura 18. Factor de pérdida en función de la frecuencia angular de los hidrogeles CNF:PVA	78
Figura 19. Difractogramas XRD de las muestras de rastrojo de piña (PALF), celulosa sin blanquear (Celulosa SB), celulosa blanqueada (Celulosa B) y CNF	79

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Determinación de la composición química de las fibras de rastrojo de piña (PALF).....	35
Cuadro 2. Distribuciones de tamaño de las nanofibras de piña medido en un equipo analizador de tamaño de partículas por difracción láser (SLS)	39
Cuadro 3. Determinación del tamaño promedio y la relación de aspecto de la CNF mediante imágenes de AFM.....	41
Cuadro 4. Índice de cristalinidad de la PALF, la celulosa sin blanquear (SB), la celulosa blanqueada (B) y la CNF	44
Cuadro 5. Datos de TGA de la obtención de las nanofibras de celulosa de piña	45
Cuadro 6. Determinación del límite elástico de los hidrogeles CNF:PVA a partir del comportamiento viscoelástico en función del esfuerzo cortante	50
Cuadro 7. Pruebas de impresión iniciales con CNF:PVA 2:1 a 21°C.....	52
Cuadro 8. Pruebas de impresión 3D iniciales del hidrogel CNF:PVA 1:1 a 21°C	53
Cuadro 9. Comparación de la impresión del hidrogel CNF:PVA 1:1 a distintas alturas de objeto y su estructura liofilizada.....	54
Cuadro 10. Determinación de la degradación de los hidrogeles impresos de CNF:PVA 1:1 en cultivo DMEM a 37°C	56
Cuadro 11. Imágenes por fluorescencia del crecimiento de las células NIH/3T3 sobre la estructura impresa de CNF:PVA 1:1 en los días 1, 4 y 7 de cultivo celular	62
Cuadro 12. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la adhesión celular de las células NIH/3T3 en la estructura impresa de CNF:PVA 1:1	64

LISTA DE ABREVIACIONES

- ATR** Reflectancia Total Atenuada
- CMF** Microfibrillas de Celulosa
- CNC** Nanocristales de Celulosa
- CNF** Nanofibras de Celulosa
- DIW** Escritura Directa con Tintas (del inglés “Direct Ink Writing”)
- DLS** Dispersión de Luz Diferencial (del inglés “Differential Light Scattering”)
- DMEM** Medio de Cultivo de Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
- DSC** Calorimetría Diferencial de Barrido
- D1-Msc** Células Madres de Ratón
- GeMA** Gelatina Metacrilada
- HA** Ácido Hialurónico
- hASCs** Células Madre derivadas de Tejido Adiposo Humano
- PALF** Fibras de Hojas de Piña (del inglés “Pineapple Leaf Fiber”)
- SEM** Microscopía Electrónica de Barrido
- SLA** Estereolitografía
- SLS** Sinterización por Láser Selectiva
- TEMPO** Radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil
- TGA** Análisis Termogravimétrico
- XRD** Difracción de Rayos X
- 3D** Tercera Dimensión

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Diversas investigaciones, tanto a nivel nacional como internacional, han demostrado la viabilidad de producir nanofibras de celulosa (CNF) a partir de residuos vegetales con un costo económico favorable. A nivel internacional, se ha reportado la extracción de nanofibras de celulosa de biomásas conformadas por residuos de: hierbas de suelo *Salicornia ramisissima*,¹ toronja,² papa,³ microalgas de plantas de tratamiento,⁴ de la fruta de *Nypa*,⁵ de horticultura y ramas herbáceas de vid,⁶ hoja del maíz,⁷ durian,⁸ entre otros. A nivel nacional, se han extraído nanofibras de celulosa a partir de rastrojo de piña, mediante métodos químicos y mecánicos.⁹

En años recientes, las nanofibras de celulosa han sido utilizadas en la formulación de biotintas para impresión 3D, de matrices utilizadas en medicina regenerativa. Se han desarrollado biotintas de nanofibras de celulosa con gelatina-metacrilada para la biofabricación de sustratos biomiméticos para regeneración de tejidos blandos¹⁰ y biotintas de nanofibras de celulosa con goma gellan para la impresión de estructuras de soporte con células de piel.¹¹ Algunas biotintas de nanofibras de celulosa-alginato han sido utilizadas para la impresión de órganos funcionales como una oreja humana y un menisco de oveja.¹² Existe amplia información sobre el uso de las nanofibras de celulosa en hidrogeles para la bioimpresión. Sin embargo, hasta donde se tiene conocimiento no se han generado investigaciones que utilicen materias primas provenientes de residuos o sustratos distintos a la madera como fuente de nanofibras de celulosa para aplicaciones en la bioimpresión 3D.

Esta investigación propone la utilización de nanofibras de celulosa obtenidas a partir de rastrojo de piña, aisladas mediante métodos químicos y mecánicos, en el desarrollo de una biotinta con potencial aprovechamiento como biomaterial. En específico, se propone desarrollar una biotinta de nanofibras de celulosa con alcohol polivinílico, ya que esta mezcla ha demostrado potencial para uso en impresión 3D.¹³ De esta manera, no solamente se aprovecharán residuos orgánicos de la producción de piña, sino que también se contribuirá con la generación de nuevos materiales con aplicaciones futuras en el ámbito de la salud, a través de su posible aplicación en medicina regenerativa.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Piña

2.1.1 Cultivo de piña en Costa Rica

Las dimensiones de una planta adulta de piña corresponden a 1-2 m de altura y 1-2 m de ancho, con una estructura compuesta del tallo, pedúnculo, hojas, fruta múltiple, corona, brotes y raíces. El fruto de la piña es aprovechado por el ser humano, dejando el resto de la planta como residuo. La estructura general de la piña consiste en un tallo que posee una sección aérea recta y una porción subterránea de hojas sésiles (entre 40-80 por planta), raíces adventicias y la fruta (compuesta por corteza, bases de sépalos y ovarios).¹⁴

En Costa Rica la producción de piña se lleva a cabo mayoritariamente en las regiones Huetar Norte y Huetar Atlántica debido a que las zonas tropicales de la región proporcionan las condiciones adecuadas de agua, pH, nutrientes y oxígeno a las raíces, temperatura y exposición a luz solar.^{15,16} Generalmente, se utilizan algunos agroquímicos para el control de las plantas que generan competencia con la piña como: Ametrina[®], Paraquat[®], Bromacil[®] y Quizalofop-p-ethyl[®].¹⁵ Se utilizan también intensivamente fertilizantes para proporcionar una cantidad de nutrientes adecuada para el crecimiento de la planta.¹⁶

El cultivo de piña genera grandes cantidades de biomasa correspondientes al tallo y las hojas, los cuales al no ser tratados en la zona de cultivo generan distintos impactos ambientales. El ciclo comercial de la piña es de 27 meses generándose dos cosechas de frutos: una a los 15 meses de cultivo y otra a los 12 meses siguientes. Los residuos de biomasa se eliminan en cada uno de estos ciclos para poder iniciar de nuevo la producción.¹⁷

La eliminación de los residuos de piña, principalmente correspondientes al rastrojo de piña, se ve complicada por el gran volumen de residuos, la lenta degradación del producto y los altos contenidos de silicio en las fibras de celulosa. Debido a esto, el método más empleado para eliminar el residuo consiste en el cortado del residuo seguido por un desecado y quemado con herbicidas.¹⁷ Se ha demostrado que el uso de estos agroquímicos tiene un efecto contaminante en mantos acuíferos, aire y suelos.¹⁵ Según el Instituto Regional de Estudios en Toxicología (IRET) de la Universidad Nacional, el herbicida bromacil fue encontrado en nacientes de agua en distintos pueblos del cantón de Siquirres, Limón. Este herbicida es tóxico para el ser humano.¹⁵

Además, el manejo inadecuado de los desechos del cultivo de piña propicia problemas para el ganado en estas zonas, ya que aumenta la proliferación de la mosca *Stomoxys calcitrans*.¹⁸ Este insecto conocido como la mosca de los establos aprovecha los residuos que son enterrados para descomposición, para completar su ciclo biológico, lo cual afecta actividades agrícolas, mediante propagación de enfermedades virales o bacterianas, afectando la producción de carnes y lácteos.¹⁸

2.1.2 Celulosa

La celulosa es un polímero natural conformado por unidades de glucopiranososa D-anhidrido con enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 4) y se encuentra abundantemente en la naturaleza, en los tejidos vegetales. Este polímero natural posee propiedades de interés como: una relación de aspecto variable, fuertes propiedades mecánicas, baja densidad, fácil procesamiento y un costo económico reducido.¹⁹

La celulosa que está presente en el material vegetal posee una estructura organizada jerárquicamente. A nivel macroscópico se encuentran las fibras naturales, las paredes celulares y las microfibrillas.²⁰ Por otro lado, a nivel nanoscópico se encuentran las microfibrillas (CMF), las nanofibras (CNF) y los nanocrisales (CNC). Sin importar su origen, la estructura nanoscópica de la celulosa es la que define las propiedades físicas y químicas de interés que posee la celulosa.²⁰

La CMF, al ser una unidad supramolecular, está compuesta por cadenas poliméricas paralelas con un diámetro aproximado de 100 nm o más y una longitud variable dependiendo de su origen.²¹ Además, la CMF posee regiones cristalinas y amorfas, ver Figura 1. Cabe destacar que el porcentaje de regiones amorfas es mayor en celulosa proveniente de plantas superiores que en la celulosa proveniente de las bacterias.²¹

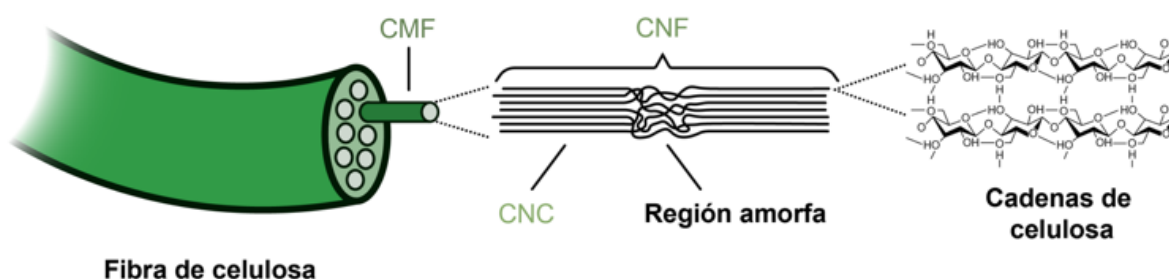


Figura 1. Representación general de la jerarquía estructural de las fibras de celulosa²²

2.1.3 Nanofibras de celulosa provenientes de residuos vegetales

Las nanofibras de celulosa se encuentran en la pared celular de las plantas, sumergidas en una matriz de hemicelulosa, lignina y pectina. La estructura geométrica de las células vegetales varían desde células con estructura tipo panal semejante a la madera y células con estructura de parénquima de las frutas y vegetales.²³ Las paredes delgadas de la parénquima ayudan a facilitar la separación de las nanofibras.^{24,25} Las hemicelulosas también juegan un rol beneficioso en la separación de las nanofibras de celulosa, ya que las nanofibras han presentado una disminución en endurecimiento y una fuerza mecánica superior al presentar hemicelulosas en su superficie.^{26,27} El rol de la pectina sobre el proceso de fibrilación es menos comprendida, pero se sugiere que la pectina y la hemicelulosa deben ser reducidas para permitir la separación de las nanofibrillas.²⁸

Las nanofibras de celulosa han sido aisladas a partir de varios tipos de residuos agroindustriales. Por ejemplo, el bagazo de caña,²⁹ la hoja de piña,³⁰ la cáscara de mandarina,²⁸ la cáscara de naranja,³¹ la zanahoria,²⁵ los residuos de toronja,² los residuos de papa,³² las microalgas de plantas de tratamiento,⁴ la hoja del maíz,⁷ entre otros. Todas estas han sido materias primas utilizadas para la producción de nanofibras de celulosa mediante distintos métodos mecánicos, en algunos casos con un pretratamiento químico o enzimático. Existen algunos beneficios reportados respecto al uso de residuos agroindustriales para la separación de nanofibras de celulosa, como por ejemplo llevar a procesos más eficientes energéticamente y sostenibles en la producción de nanocelulosa.³³

En Costa Rica, se han aislado las nanofibras de celulosa a partir del rastrojo de piña mediante métodos químicos y mecánico: (1) por oxidación con radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (conocida como TEMPO) seguido por dispersión de alto rendimiento a 17000 rpm durante 5 min y (2) por oxidación con radical TEMPO seguido por 2 pases en un homogeneizador de alta presión usando geometrías en serie de 400 y 200 μm . El método utilizando desintegración mecánica resultó extraer más eficientemente las nanofibras que el método con dispersión de alto rendimiento.³⁴

2.2 Impresión 3D y fabricación aditiva

La impresión 3D inició a nivel industrial, donde se le conocía como la tecnología de manufactura aditiva. La tecnología de la manufactura aditiva fue diseñada inicialmente para el curado por luz ultravioleta (UV) de los fotopolímeros durante los años 80 al introducir la Estereolitografía (SLA). Años después, el método fue expandido a la Sinterización por Láser Selectiva (SLS) al reemplazar la luz UV con un rayo láser y alterando la entrada de alimentación a un polímero pulverizado.³⁵ A partir de esto, las tecnologías de manufactura aditiva emergieron rápidamente y las técnicas basadas en extrusión y chorro de aglomerante (binder jetting en inglés) fueron establecidas.³⁵

En 2010, la American Society for Testing and Materials (ASTM) introdujo el estándar ASTM F42-Additive Manufacturing Standard (Estándar de Manufactura Aditiva) para clasificar la tecnología en 7 categorías: extrusión de material, polimerización en masa, fusión del lecho de polvo (polímero), chorro de material, chorro de aglomerante, laminación de láminas y deposición de energía dirigida.³⁵ En 2022 la ASTM actualizó la norma ISO/ASTM 52900:2021, donde la manufactura aditiva fue ampliada y definida como un proceso para la unión de materiales para la creación de materiales a partir de datos de modelado 3D, usualmente capa por capa, lo cual lo diferencia de tecnologías de manufactura sustractivas o formativas.^{36,37}

Las estructuras desarrolladas por la manufactura aditiva son aplicables en una gran cantidad de campos de estudio como: la biomedicina e ingeniería de tejidos (e.g. implantes, estructuras bioimpresas cargadas de células, andamios de cultivo celular, apósitos para heridas y liberación de fármacos),³⁸⁻⁴² sistemas de almacenamiento de energía (e.g. baterías, supercapacitores, disipadores de calor, termitas y aisladores),⁴³⁻⁴⁵ electrónicos y sensores (electrónicos flexibles, electrodos, fotodetectores, indicadores, dispositivos calibradores, dispositivos de monitoreo de señales fisiológicos y transmisores),⁴⁶⁻⁴⁸ robótica suave (electrónicos suaves y actuadores),⁴⁹⁻⁵¹ aplicaciones ambientales (captura de CO₂, tratamiento de aguas, utilización de luz solar y catalizadores avanzados),^{3,52} aplicaciones estructurales (muebles, construcciones grandes como puentes y casas)^{53,54} y otras aplicaciones (formación de patrones, empaques, óptica, sistemas de microfluídica, aplicación aeroespacial y aviación).³⁵

En el sector biomédico, la manufactura aditiva ha generado una revolución debido a la obtención de estructuras personalizadas mediante modelaje 3D y sistemas de escaneo 3D.³⁵ La Escritura Directa con Tintas (Direct Ink Writing o DIW, por sus siglas en inglés) tiene ventajas en la creación de este tipo de estructuras. La impresión por DIW se basa en la extrusión de un material y permite la deposición del mismo de manera continua y por capas. Mediante esta técnica, se requiere que el material a imprimir presente un flujo viscoso en respuesta a un esfuerzo cortante y la recuperación rápida de su estructura posterior a la relajación. Los hidrogeles han emergido como materiales de interés en DIW debido a su comportamiento viscoelástico⁵⁵

Los hidrogeles para DIW deben cumplir con criterios esenciales como: propiedades reológicas adecuadas, biocompatibilidad, degradabilidad controlada, fuerza mecánica adecuada, hinchamiento y aspectos económicos razonables dependiendo de la aplicación.³⁵ La mayoría de los hidrogeles utilizados en las técnicas DIW tienen un contenido de sólidos bajo, por lo que tienen menor fuerza mecánica.³⁵

Las primeras impresiones 3D llevadas a cabo en la biomedicina se hicieron en 1999.³⁵ Desde esa primera impresión, se han usado sistemas de digitalización e impresión 3D para la fabricación de modelos ortopédicos,⁵⁶ dispositivos e instrumentos médicos,⁵⁷ implantes de hueso y dentales,^{58,59} agregados celulares^{60,61} y aplicación de liberación de medicamentos con dosis específica.^{62,63}

2.3 Biopolímeros como componentes de biotintas de impresión 3D

2.3.1 Propiedades de las biotintas de impresión 3D

A la hora de escoger la biotinta a utilizar en bioimpresión, las propiedades del material deben ser optimizadas de acuerdo con el tipo de tejido biológico de interés, debido a que las propiedades de la tinta influyen en la estructura y funcionalidad del tejido a desarrollar. En específico, las propiedades a considerar son la fuente celular, las propiedades mecánicas, la interacción biológica, el proceso de gelación, la reología, y la rigidez de la biotinta.⁶⁴ También se deben considerar la procesabilidad de la biotinta desarrollada y si es capaz de mantener su estructura post-impresión. Hay algunos parámetros que pueden afectar el procesamiento de la biotinta como: capacidad de entrecruzamiento, viscosidad, tensión superficial y propiedades superficiales del sistema de extrusión de la impresora. Estas

propiedades requieren ser configuradas y optimizadas de acuerdo a la aplicación deseada de bioimpresión.⁶⁵

Las tecnologías de manufactura aditiva tienen una ventana específica de propiedades reológicas que deben tener los hidrogeles de procesado o las biotintas. Generalmente, se han utilizado algunos polímeros sintéticos para el desarrollo de biotintas como: acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico (PLA), entre otros.⁶⁶ Sin embargo, los biopolímeros han sido utilizados en las biotintas para ajustar las propiedades reológicas, controlar el encogimiento y tiempo de secado e implementar propiedades de gradiente relacionadas al diseño del material de biotinta³⁵. Los biopolímeros más utilizados para esta aplicación son las nanofibras de celulosa,^{10,12,67-71} los nanocristales de celulosa,^{35,72} las partículas de lignina, la agarosa, la goma konjac, la seda, el colágeno, el quitosano, el alginato, el gelatina, el dextrano, el ácido hialurónico, los agregados de células, la goma gellan y la fibrina.⁶⁶ Algunos casos han demostrado el uso de celulosa bacteriana como material en las biotintas.⁷³

2.3.2 Biotintas basadas en nanocelulosa y alcohol polivinílico

En la literatura, se detalla el uso de nanofibras de celulosa como un material de interés para el desarrollo de biotintas de impresión. Principalmente se han utilizado las nanofibras como un componente de reforzamiento de las biotintas.⁶⁶ Una mayor parte de la literatura detalla el desarrollo de biotintas de nanofibras de celulosa mezcladas con algún otro polímero que facilite el entrecruzamiento del material post-impresión. En especial, las nanofibras de celulosa oxidadas por TEMPO han sido de gran interés debido a que esta oxidación introduce grupos aldehído y carboxilo en la superficie de las nanofibras⁷⁴ y los grupos carboxilo pueden acomplejarse con Ca^{2+} en la superficie de las nanofibras y generar un entrecruzamiento.⁷⁵ Además, las dispersiones acuosas de las nanofibras de celulosa tienen un carácter tipo-gel a concentraciones bajas (0,5%), gracias al enredamiento de las fibras y la formación de puentes de hidrógeno.⁷⁴

Por ejemplo, algunos autores detallan el uso de nanofibras de celulosa oxidadas por TEMPO y gelatina metacrilada (GelMA) extraída de gelatina de bovino o pescado para crear una biotinta que se entrecruza con un fotoiniciador y luz ultravioleta. Esta biotinta presentó propiedades adecuadas para bioimpresión y un soporte adecuado para la proliferación de células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASCs).¹⁰

Otras investigaciones han utilizado una mezcla de nanofibras de celulosa oxidadas con TEMPO y alginato en distintas proporciones, donde se utilizar CaCl_2 para generar el entrecruzamiento de los polímeros.^{12,71,75,76} Estos dos agentes han sido estudiados en la impresión 3D de andamios para la creación de tejido de cartílago, en especial porque las nanofibras de celulosa imitan la matriz de colágeno del tejido de cartílago y los hidrogeles de alginato regeneran células de cartílago *in vivo*.⁷⁰ Estructuras impresas de hidrogeles de nanocelulosa oxidada con TEMPO y alginato han demostrado una fuerza mecánica mayor, debido a la capacidad de entrecruzamiento de los dos componentes con el Ca^{2+} .⁷⁷ Para los condrocitos, o células de cartílago, la combinación de alginato sulfatado con nanocelulosa presentó viabilidad celular prometedora.⁷⁶

Además de las ventajas con respecto a la viabilidad para el crecimiento de células condrocitos o de células madre, la nanocelulosa también proporciona propiedades mecánicas importantes. En específico, las nanofibras de celulosa evitan la sinéresis de geles de alginato y proporcionan mayor resistencia a la compresión a deformaciones pequeñas, evidenciado en el incremento del Módulo de Young en geles de nanocelulosa-alginato.⁷⁴ Se reporta que el uso de nanofibras oxidadas con TEMPO incrementa este efecto del Módulo de Young y que los geles son estables en volumen y no se disminuye su fuerza mecánica al agregar tratamientos salinos.⁷⁴ El incremento del Módulo de Young demuestra que las nanofibras de celulosa mejoran las propiedades mecánicas de las biotintas de impresión.

Para aumentar la estabilidad y propiedades en húmedo de las nanofibras de celulosa oxidadas, se ha utilizado alcohol polivinílico como material de entrecruzamiento para las mismas. La mezcla de TOCNF y PVA se ha detallado para la creación de películas plásticas, para la técnica de “wet-spinning” y la creación de hidrogeles para impresión 3D.^{13,78,79} En la Figura 2, se observa la reacción de esterificación que ocurre entre las fibrillas del TOCNF y el PVA en medio ácido.

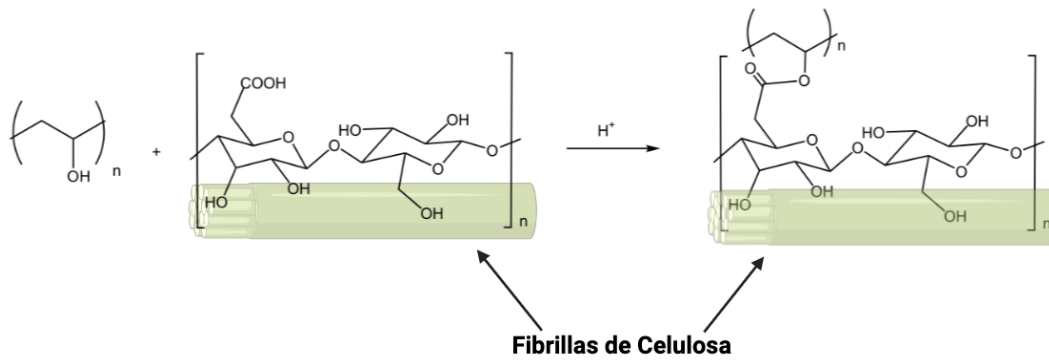


Figura 2. Esquema de la reacción de esterificación en medio ácido entre las nanofibras de celulosa oxidadas por TEMPO (CNF) y el PVA en la superficie fibrilar⁷⁸

Para impresión 3D, se ha detallado el uso de TOCNF y PVA para biotintas de impresión 3D con porosidad y estabilidad adecuada para aplicaciones biomédicas.¹³ El PVA tiene propiedades interesantes como biocompatibilidad, carácter no tóxico, no carcinógeno, estabilidad térmica, biodegradabilidad y alta capacidad de hinchamiento.^{80,81}

2.3.3 Parámetros reológicos relacionados a la bioimpresión 3D

Debido a los requerimientos reológicos que conlleva la técnica de la impresión 3D, se deben conocer las propiedades viscoelásticas de cualquier material previo a realizar ensayos de impresión. Esto en especial para el caso con los hidrogeles, ya que al mantener un alto contenido de agua pueden ser inestables a la hora de imprimir.¹³ Hay 3 pasos críticos a la hora de realizar la extrusión mediante la impresión 3D de un material, demostradas en la Figura 3.

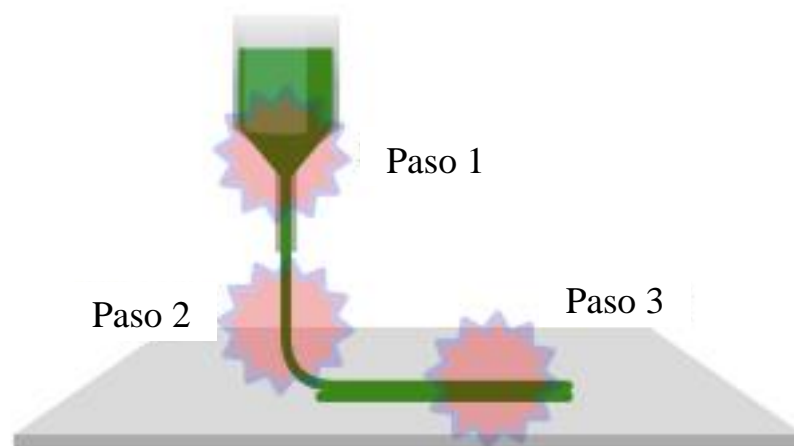


Figura 3. Pasos críticos durante el proceso de extrusión de un material afectados por la reología del hidrogel⁸²

La impresión DIW busca que los hidrogeles mantengan un comportamiento pseudoplástico (shear-thinning en inglés). Esto se debe a que en el paso 1 de impresión, que corresponde al paso del material por la boquilla, se necesita que el fluido en reposo disminuya en viscosidad al ser sometida a una fuerza dada. Esto permitirá el material atravesar la boca de extrusión. Los fluidos pseudoplásticos son aquellos que presentan un comportamiento no Newtoniano y su comportamiento es independiente al tiempo. Estos materiales presentan una disminución en la viscosidad aparente (μ) conforme se aumenta la velocidad de cizallamiento.⁸²

Para estudiar este comportamiento en hidrogeles para uso en impresión 3D, se realiza un ensayo de viscosidad aparente en función de una velocidad de cizallamiento determinada mediante un reómetro, donde se espera obtener una curva que se ajuste a la ley de potencia (ecuación 1).⁸²

$$\mu = K(\dot{\gamma})^{n-1} \text{ (ecuación 1)}$$

Se puede utilizar la ley de potencia (ver ecuación 1) para relacionar la viscosidad aparente (μ) con dos parámetros empíricos, los cuales corresponden a: K , el índice de consistencia (medido en $\text{Pa}\cdot\text{S}^n$) y n , el índice de flujo. Si el valor de n es menor a 1, el fluido es pseudoplástico. Si el valor de n es igual a 1, entonces se considera un fluido Newtoniano. Si n es mayor a 1, entonces el fluido es dilatante.⁸²

Además de estudiar la viscosidad del hidrogel, es necesario conocer su comportamiento viscoelástico mediante un ensayo reológico en función de la deformación en cizalla. En especial se debe de conocer su módulo de pérdida, G'' , y su módulo de almacenamiento, G' , donde el G'' describe la rigidez y G' la amortiguación de un material. Esto es importante porque en el paso 2 de impresión (ver Figura 3), el hidrogel debe de presentar la resistencia mecánica para minimizar la deformación, recuperar un grado de viscosidad alta y asegurar un flujo uniforme.⁸² Por lo tanto, se debe determinar si el hidrogel presenta un comportamiento viscoso ($G'' > G'$) o un comportamiento elástico ($G' > G''$), ya que esta propiedad define la forma del filamento que se imprime.⁸²

El límite elástico (conocido como yield stress en inglés) también es un parámetro crucial para la determinación de la calidad de la impresión 3D de un hidrogel debido a que los materiales con un límite elástico adecuado y un módulo de almacenamiento mayor al módulo de pérdida demuestran la capacidad de mantener su estructura.⁸³ El límite elástico es el punto donde el material permite ser estirado sin presentar cambios irreversibles en su estructura. Esto es importante en el paso 1 (ver Figura 3) de extrusión, ya que el límite elástico debe ser superado por la fuerza aplicada en la boquilla de extrusión.^{13,82}

$$\tau_{max} = \frac{\Delta P \cdot r}{2L} \text{ (ecuación 2)}$$

Para determinar el límite elástico máximo que se puede aplicar en la boquilla de extrusión, se utiliza la ecuación 2, donde ΔP (Pa) corresponde a la presión máxima aplicada, r corresponde al radio (mm) y L (mm) a la longitud de la boquilla.¹³

El tercer punto de impresión corresponde a la construcción capa por capa de la estructura. Durante este paso, es esencial que el hidrogel desarrolle un carácter de auto-mantenimiento para poder resistir el peso de las capas a imprimir y evitar la deformación. Un parámetro importante para determinar este comportamiento es el $\tan(\delta)$ (que es equivalente a G''/G').

Hidrogel con un $\tan(\delta)$ menor a 0,1 son fuertes y proveen integridad de estructura al material. Los que poseen un $\tan(\delta)$ menor a 1 son de un carácter más débil y tienden a colapsar si no hay un método de entrecruzamiento en el paso 3 de impresión. Por lo tanto, se requiere un balance en estos factores para mantener una impresión adecuada.⁸²

Para esto, se debe realizar un ensayo de frecuencia angular a una deformación de cizalla que esté dentro del rango viscoelástico lineal para determinar el G' , G'' y el $\tan(\delta)$ correspondiente al material.¹³ El rango viscoelástico lineal (LVR), corresponde a aquella región donde se pueden efectuar un ensayo reológico oscilatorio sin destruir la estructura de la muestra, el cual se determina mediante en el ensayo viscoelástico de donde G' y G'' se grafican en función de la deformación en cizalla.⁸²

2.3.4 La bioimpresión 3D y la medicina regenerativa

La medicina regenerativa es el campo de la medicina que busca reparar o restaurar las funciones de los órganos o tejidos vivos dañados por la edad, la enfermedad o el trauma. Han emergido estudios preclínicos prometedores que apoyan la posibilidad de tratar tanto la enfermedad crónica o aguda, donde la medicina regenerativa pueda aliviar la enfermedad que

ocurran en un rango de sistemas de órganos y contextos.⁸⁴ Esto incluye heridas de piel, enfermedades o traumas cardiovasculares, tratamientos para cáncer, entre otros. La medicina regenerativa emerge como posible solución a las limitaciones de las terapias de trasplante de tejido y órganos actuales en fallos de órganos y tejidos debido a la escasez de donantes y complicaciones inmunes severas. El campo de la medicina regenerativa abarca muchas estrategias como el uso de materiales y células regeneradas de nuevo para reemplazar tejidos estructural o funcionalmente o para contribuir a la sanación de heridas.⁸⁴

Para determinar si un material tiene potencial para su uso en aplicaciones biomédicas y medicina regenerativa, es necesario realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Existe la norma ISO 10993-5, que establece varias formas de realizar estos ensayos: por método directo, indirecto y por adhesión.^{70,85,86} En el método por adhesión, las células madre a estudiar son sembradas en el material. Por el método directo, las células madre son primero sembradas en un plato y el material es colocado encima de las células. En el método de ensayo indirecto, se toma el material a estudiar, se incuba en un cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) por 24 horas, se extrae el lixiviado (el cultivo DMEM que tuvo contacto con el material) y se siembra las células madre en el lixiviado obtenido.⁷⁰ El presente estudio utiliza el método indirecto como ensayo de biocompatibilidad.

La bioimpresión 3D está emergiendo como parte de las técnicas de uso para la medicina regenerativa, ya que puede manufacturar tejido complejo como andamios de hueso o glándulas con uso en enfermedades endocrinas. Debido a la necesidad de crear una duplicación morfológica, se requiere un instrumento de fabricación preciso que pueda generar estructuras de conexión entre diferentes tipos de células vivas, por lo que el estudio de la impresión 3D ha avanzado.⁸⁷ Existe amplia literatura acerca del estudio de biomateriales impresos en 3D y su posibilidad de regenerar tejidos de cartílago, hueso, piel, entre otros. Se han utilizado materiales como colágeno, gelatina, nanocelulosa, alginato, entre otros como base para materiales impresos con potencial uso para la medicina regenerativa.^{67,74,88,89}

Debido a la alta disponibilidad de grandes cantidades de material lignocelulósico en el país, y su aprovechamiento en la creación de nanomateriales a nivel nacional,³⁴ es de interés indagar acerca de la viabilidad de aplicación de materiales locales para un posible uso en bioimpresión 3D y medicina regenerativa. A nivel nacional, no han sido estudiadas las nanofibras de celulosa obtenidas a partir de residuos agrícolas en las aplicaciones

biomédicas. El presente trabajo busca desarrollar una biotinta a partir de materiales lignocelulósicos y, en especial, de nanofibras de celulosa obtenidas de residuos agrícolas para potencial uso en medicina regenerativa.

Capítulo III: OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Las nanofibras de celulosa provenientes de residuos lignocelulósicos muestran un rango de propiedades reológicas (viscosidad, viscoelasticidad), morfológicas (tamaño de fibra) y químicas (grado de oxidación) que potencialmente permiten su uso como sustrato para el desarrollo de una biotinta de impresión 3D.

3.2 Objetivo general

Desarrollar un hidrogel a partir de residuos lignocelulósicos para la evaluación de su potencial aplicación como biotinta en ensayos de bioimpresión 3D.

3.3 Objetivos específicos

1. Obtener nanofibras de celulosa a partir de residuos lignocelulósicos mediante procesos químico-mecánicos.
 - a. Actividad 1.1: Ejecución de la extracción de celulosa de los residuos lignocelulósicos.
 - b. Actividad 2.1: Realización de la oxidación mediada por TEMPO y métodos de degradación mecánica a la celulosa obtenida de los residuos lignocelulósicos.
2. Caracterizar factores físico-químicos de las nanofibras de celulosa provenientes de residuos lignocelulósicos.
 - a. Actividad 2.1: Análisis de las propiedades térmicas de las nanofibras de celulosa mediante TGA.
 - b. Actividad 2.2: Análisis de las propiedades químicas de las nanofibras de celulosa mediante FTIR y titulación potenciométrica.
 - c. Actividad 2.3: Análisis de las propiedades morfológicas de las nanofibras de celulosa mediante AFM y SEM.
3. Preparar una biotinta reforzada con nanofibras de celulosa provenientes de residuos lignocelulósicos.

- a. Actividad 3.1: Creación de al menos tres distintas biotintas de nanofibras de celulosa.
- b. Actividad 3.2: Caracterización de las propiedades reológicas de las distintas biotintas de nanofibras de celulosa.
- c. Actividad 3.3: Realizar ensayos de extrusión y entrecruzamiento de la biotinta de nanofibras de celulosa.
- d. Actividad 3.4: Caracterización de las propiedades de hinchamiento, degradación y morfológicas del material impreso de nanofibras de celulosa.

Capítulo IV: METODOLOGÍA

4.1 Extracción y caracterización de las nanofibras de celulosa (CNF)

4.1.1 Reactivos químicos

Se utilizó 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO, 98% m/m), bromuro de sodio (NaBr, 99%), ácido clorhídrico (HCl, 37%), cloruro de sodio (NaCl, 99%), clorito de sodio (NaClO₂, 80%), hidróxido de sodio (lentejas, 98%) y alcohol polivinílico (MM=31000-50000 g/mol).

Se recolectó rastrojo de piña en la zona de San Carlos, Alajuela en una plantación de piña orgánica, la cual se almacenó a temperatura ambiente en bolsas plásticas negras para ser trasladadas hasta el Laboratorio de Polímeros (POLIUNA) de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, Heredia.

4.1.2 Caracterización de la composición química del material de partida

Se utilizaron las normas TAPPI T 204⁹⁰ y T 222⁹¹ para la determinación de extraíbles y la determinación de lignina Klason, respectivamente, del rastrojo de piña orgánica. Además, se utilizaron el Método Usual WISE para la determinación de holocelulosa y hemicelulosa de la hoja de rastrojo de piña.⁹²

4.1.3 Desestructuración de las hojas del rastrojo de piña orgánica para la obtención de PALF y fibras de celulosa

Las hojas de rastrojo de piña orgánica fueron tratadas mediante un proceso de decorticación brindado por la empresa piñera para eliminar la parte externa de la hoja y obtener fibra de rastrojo de piña (PALF).

Se realizó una extracción de celulosa a la PALF obtenida con NaOH 4% m/m durante 2 horas con agitación constante. Al finalizar la reacción, se neutralizaron las fibras con agua desionizada. Posteriormente, se realizó un blanqueamiento de las fibras, sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 3% comercial durante 2 horas y media. Al culminar el blanqueamiento, se neutralizaron la fibra con agua desionizada.⁹³

4.1.4 Obtención y desintegración de las nanofibras de celulosa (CNF)

Se realizó una oxidación con 0,025 g de radical TEMPO, 2 g en seco de celulosa de piña, 0,25 g de bromuro de sodio y 10 mmol/g de hipoclorito de sodio en 150 mL de agua desionizada con agitación constante. La reacción se mantuvo a un pH de 10, agregando NaOH 0,1 M paulatinamente. Se llevó a cabo la reacción durante 3 horas y media o hasta que

no se observen cambios en el pH. Al finalizar la reacción, se neutralizó la muestra.^{94,95} La fibra obtenida se suspendió en agua desionizada al 2% m/v en base seca.

Posteriormente, se realizó una dispersión de las fibras utilizando una licuadora de laboratorio, dispersando la muestra durante 15 min.⁹

Al realizar la dispersión, se realizó una desintegración mecánica con un homogeneizador de alta presión (Microfluidics M-110P) a 30000 psi, pasando la muestra por dos disposiciones de cámara en serie de 200 μm y 80 μm .⁹ En este proceso se obtuvo un hidrogel de nanofibras de celulosa (CNF).

4.1.5 Caracterización de las nanofibras de celulosa (CNF)

4.1.5.1 Determinación del contenido de carboxilatos

Para la determinación del grado de carboxilatos se colocó la muestra tratada con TEMPO en cloruro de sodio 0,001 M con agitación constante. Se agregó HCl 0,5 M hasta llegar a un pH entre 2,5 y 3 y se mantuvo en agitación durante 4 horas. Posteriormente, se utilizó NaOH 0,005 M como agente titulante hasta llegar a pH 11. El contenido de carboxilatos se determinó mediante la curva conductimétrica medida en conductímetro.⁹⁶

El contenido de carboxilatos se calculó mediante la curva conductimétrica, donde se graficó la conductividad de la suspensión contra el volumen de NaOH (mL). La diferencia en volumen de NaOH entre el inicio y final de la región de meseta del gráfico, determinadas por la intersección de las líneas de regresión, representó la cantidad de NaOH utilizada para neutralizar los grupos carboxilatos de las nanofibras de celulosa. El resultado de contenido de carboxilo fue calculado mediante la ecuación:

$$\text{Contenido de Carboxilatos} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \frac{\Delta V C_{\text{NaOH}}}{m}$$

En la ecuación, ΔV corresponde a la diferencia de volumen de NaOH en la región de la meseta, C_{NaOH} a la concentración de NaOH utilizada como agente titulante y m a la masa de las nanofibras de celulosa utilizadas.⁹⁷

4.1.5.2 Determinación de la carga superficial y tamaños de las nanofibras de celulosa (CNF)

Se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) mediante el equipo Zetasizer (Malvern Instruments, Nano-ZS90) con un ángulo de 90° equipado con un láser He-Ne a una temperatura controlada de 25 °C, cubetas capilares de poliestireno y haciendo 5 repeticiones

con 10 corridas cada una. Mediante esta técnica, se determinó el z-potencial y tamaño de las nanofibras de celulosa de piña, mediante el software Ultra (Malvern Instruments), el tamaño se reporta en nanómetros y el Z-potencial en unidades de milivoltios (mV).⁹

Se utilizó la técnica de espectroscopía de difracción de laser estático (SLS) mediante el equipo Mastersizer (Malvern Instruments. 3000 HydroMV) para determinar el tamaño de las nanofibras de celulosa en suspensión acuosa. La suspensión de TOCNF al 1% fue agregada al vaso del equipo hasta obtener una obscuración de 10-20%, con una velocidad de bomba de 2000 rpm. Los resultados presentados son un promedio de seis mediciones.⁹⁸

4.1.5.3 Determinación de la morfología y dimensiones de las nanofibras de celulosa (CNF)

Para determinar la morfología de las suspensiones de nanofibras, se tomaron 50 μL de la muestra y se vertieron sobre discos de mica previamente exfoliados. Posteriormente, se tomaron imágenes mediante el microscopio de fuerza atómica (AFM) (Oxford, Jupiter XR) con el método de “tapping” a $10 \times 10 \mu\text{m}$ y $5 \times 5 \mu\text{m}$. Se utilizaron puntas PPP-NCHR con una frecuencia de resonancia de 330kHz, constante elástica 42 N/m y un radio de punta $< 10 \text{nm}$. Las imágenes obtenidas se procesaron con el software de uso libre ImageJ para determinar diámetro por altura relativa en nanómetros (nm) y longitud de las fibras en nanómetros (nm).⁹⁹

Además, se utilizó la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Philips CM-100) a 100 kV, spot 3, 200 μm apertura de condensador y 50 μm apertura de objetivo de las nanofibras de celulosa diluidas y depositadas sobre mesh Formvar 400 con película de carbono con tinta de acetato de uranilo.¹⁰⁰ Las imágenes fueron tratadas mediante el software Image J para determinar el diámetro de las nanofibras de celulosa.

Se analizó la cristalinidad aparente de las muestras de PALF, celulosa sin blanquear, celulosa blanqueada y CNF mediante difracción de rayos X con el difractor (Empyrean, Siemens) aplicando radiación $\text{CuK}\alpha$ (longitud de onda de 0.154 nm) y modo de exploración por pasos (2θ rango: 5° a 50°). Esta medición se realizó mediante un ensayo para cada muestra y el índice de cristalinidad (I_c) se calculó utilizando el método empírico de Segal, 1959, donde se utilizó la siguiente ecuación:¹⁰¹

$$C_{Ic\%} = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} * 100 \quad (\text{ecuación 3})$$

Según Segal, I_{002} es la intensidad máxima del pico de refracción (002) ($22,6^\circ$) mientras que I_{Am} es la intensidad dispersada por la parte amorfa de la celulosa (18°). El pico de difracción (002) se encuentra en el máximo 2Θ entre 22° y 23° para celulosa I y entre 18° y 22° para celulosa II. Mientras que la intensidad de la parte amorfa en el pico mínimo está a 2Θ entre 18° y 19° para celulosa I y entre 13° y 15° para celulosa II.¹⁰¹

4.1.5.4 Determinación del espectro de absorción infrarroja de las nanofibras de celulosa (CNF)

Se efectuó el análisis de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) (Thermoscientific, Nicolet IS-50 ATR) con la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) a 25°C para obtener los espectros de absorción de las muestras de nanofibras de celulosa en el rango de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , realizando 20 mediciones por repetición. Se registraron las salidas espectrales en el modo de porcentaje de transmitancia como una función del número de onda.

4.1.5.5 Análisis de la estabilidad térmica de las nanofibras de celulosa (CNF)

Se analizó la estabilidad térmica mediante el análisis termogravimétrico (TGA) (TA Instruments, Q500), con una velocidad de calentamiento variable desde temperatura ambiente hasta los 650°C en un entorno de nitrógeno, con un flujo de 60 mL/min , para estudiar la estabilidad térmica de las nanofibras desarrolladas¹⁰². Para lograr esto, se utilizó el método de alta resolución, el cual disminuye la velocidad de calentamiento cada vez que se detecta la degradación de un componente por el aumento repentino de la variación en la pérdida de masa, permitiendo identificar señales que de otra manera no aparecerían.

4.2 Formulación de la biotinta con nanofibras de celulosa de piña

4.2.1 Desarrollo de la biotinta de nanofibras de celulosa de piña y alcohol polivinílico

Inicialmente, se probaron mezclas de las CNF con alginato. Debido a que no se obtuvo la consistencia deseada durante el inicio de la pasantía, se utilizó en su lugar el alcohol polivinílico mezclado con las CNF, debido a su capacidad de entrecruzamiento con las mismas. Para obtener biotintas con mayor cantidad de sólidos, se concentraron las nanofibras de celulosa para alcanzar un valor del 2% m/m. Posteriormente, se prepararon 2 biotintas de CNF y PVA en proporción 2:1 y 1:1 con un contenido total de sólidos de 3% . Estas se homogeneizaron con un dispersor de alto rendimiento (Ultraturrax, IKA) durante 10 min a 12000 rpm .¹³

4.2.2 Caracterización de las biotintas desarrolladas

4.2.2.1 Estudio de la reología de las biotintas

Las propiedades reológicas de las biotintas se midieron a temperatura ambiente, utilizando el reómetro (Anton Par MCR302) con un plato de acero inoxidable plano de geometría de 25 mm. Se llevaron a cabo dos mediciones reológicas: viscosidad y viscoelasticidad. En medición de flujo constante, la viscosidad fue evaluada mediante barrido de velocidad de corte desde 0,1 hasta 100 s⁻¹ seguido por un segundo barrido de 100 a 0,1 s⁻¹. Para el estudio de viscoelasticidad de cada muestra (módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdida (G'')), se programó una tasa de deformación de 1% y una frecuencia de oscilación de 0,1 a 100 Hz.⁷⁰

4.3 Impresión 3D de las biotintas

4.3.1 Extrusión del material de biotinta desarrollado

Las tintas de CNF:PVA 2:1 y 1:1 fueron extruidas mediante cartuchos de 3 mL con boquilla de impresión de calibre 18 en una impresora 3D (Cellink BioX), con un cabezal de impresión neumático. La velocidad de impresión fue de 5-7 mm/s, con una presión de extrusión variable. La temperatura del cabezal y de cama fueron 21°C y de 4°C, respectivamente. Se utilizó TinkerCad para la construcción de las geometrías a imprimir, las cuales se extrajeron en formato STL para ser llevados a la impresora 3D.

4.3.2 Caracterización de las estructuras impresas

4.3.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras impresas de CNF:PVA fueron secadas a punto crítico, para posteriormente ser recubiertas con platino (15 nm). Posteriormente, las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido (SEM) (Zeiss Crossbeam 350). Se utilizó un voltaje de 10 kV y una distancia de trabajo de 10 mm.⁷⁰

Posteriormente, las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software ImageJ, para determinar su tamaño de poro (50 poros fueron analizados en total por cada muestra). A partir del análisis de ImageJ, se procedió a crear un gráfico de distribución normal del tamaño de poro observado por SEM para determinar el promedio de tamaño de poro en las estructuras impresas de CNF:PVA.

4.3.2.2 Hinchamiento de las estructuras impresas

Para evaluar el hinchamiento, las muestras impresas con la proporción CNF:PVA 1:1 fueron liofilizadas y pesadas para obtener su masa en seco, por triplicado. Las muestras se colocaron en una solución buffer de fosfato a 37°C para estimar su capacidad de hinchamiento, obteniéndose su masa antes y después de sumergirse en la solución para calcular el porcentaje de hinchamiento.⁷⁰

4.3.2.3 Estudio de degradación

El estudio de degradación se realizó colocando las muestras impresas de CNF:PVA 1:1 en un cultivo DMEM a 37°C durante 8 días, donde al octavo día se midió su ancho y altura utilizando una regla para comparar con las dimensiones originales (5 x 15mm).⁷⁰

4.3.2.4 Ensayo de citotoxicidad de las estructuras impresas CNF:PVA con MTS

Se realizó el ensayo de citotoxicidad a través de una colaboración con el Centro Nacional de Biotecnología (CENIBIOT). Se trabajó de acuerdo a la norma ISO 10993-5 con fibroblastos embrionarias de ratón NIH/3T3.^{85,86} Primeramente, se colocaron las membranas de CNF:PVA esterilizadas en medio de cultivo DMEM al 10% FBS y 1% S/P como vehículo de extracción dentro de un vial estéril y cubiertas con Parafilm. Posteriormente, se incubaron los viales a 37±1°C y con agitación constante durante 48 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS											
B	M1 100	M1 100	M1 100	M1 100	BL	M2 100	M2 100	M2 100	M2 100	BL	PBS	
C	M1 80	M1 80	M1 80	M1 80	BL	M2 80	M2 80	M2 80	M2 80	BL	PBS	
D	M1 60	M1 60	M1 60	M1 60	BL	M2 60	M2 60	M2 60	M2 60	BL	PBS	
E	M1 40	M1 40	M1 40	M1 40	BL	M2 40	M2 40	M2 40	M2 40	BL	PBS	
F	M1 20	M1 20	M1 20	M1 20	BL	M2 20	M2 20	M2 20	M2 20	BL	PBS	
G	Do xo	Do xo	Do xo	Do xo	BL	UT	UT	UT	UT	BL	PBS	
H	PBS											

Figura 4. Representación de una placa de 96 pocillos empleada para el ensayo de citotoxicidad por extracción. Doxo: Control negativo (Doxo 20 μ M), UT: Control positivo (DMEM al 10% FBS y 1% S/P), M: Concentraciones de extractos de membrana.

(Elaboración Propia)

Posterior a la incubación, se preparó una placa de 96 pocillos para cultivo celular con 100 μ L de PBS en los pozos del extremo derecho y 100 μ L de DMEM al 10% FBS y 1% S/P como blanco en los espacios indicados por la Figura 3. Los pozos fueron sembrados con células NIH/3T3 (7500 células/100 μ L) y fueron incubadas durante 24 horas (5% CO₂, 37°C, >90% humedad) para formar una monocapa con una confluencia del 80%.

Posteriormente, se aseguró una confluencia de los cultivos en el microscopio óptico. Se realizó una dilución de Doxorubicina (Doxo) hasta alcanzar 20 μ M. Se retiró el medio de cultivo de los pocillos con células de la placa y se realizó lavados de los mismos con 50 μ L de FBS. Luego, se agregaron 100 μ L del extracto de las estructuras impresas de CNF:PVA en las concentraciones de 100, 80, 60, 40 y 20% de acuerdo a la Figura 3. Se agregó 100 μ L de DMEM al 10% FBS y 1% S/P como control positivo y 100 μ L Doxo como control negativo, según lo indicado en la Figura 3. La placa se llevó a incubar durante 24 hr (5% CO₂, 37°C, >90% humedad) para luego evaluar la citotoxicidad.

Para analizar la citotoxicidad, se adicionó a cada pocillo 20 μ L de la solución de MTS y se incubó por 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se agitó la placa y se midió la absorbancia a una longitud de onda de referencia de 490 nm. Con los resultados obtenidos se midió el porcentaje de viabilidad de acuerdo a la ecuación 3, tomando en cuenta el promedio de las absorbancias y se restó su respectivo blanco.

$$\%Viabilidad = \frac{100 \times OD_{n490M}}{OD_{n490CN}} \text{ (ecuación 4)}$$

4.3.2.5 Ensayo de proliferación celular de las estructuras impresas CNF:PVA

Se realizó el ensayo de proliferación a través de una colaboración con el Centro Nacional de Biotecnología (CENIBIOT). Para evaluar la proliferación celular, se sembraron 10000 células fibroblastos embrionarias de ratón NIH/3T3 sobre la membrana y se utilizó Alamar Blue siguiendo las instrucciones del manual del reactivo. La fluorescencia fue detectada con un lector de microplacas BioTek Synergy H1 los días 1, 4 y 7. Para evaluar la

proliferación celular mediante microscopia de fluorescencia, se sembraron 10000 células sobre la membrana y se utilizó CellTracker™ Fluorescent Probes siguiendo las instrucciones del manual del reactivo. Finalmente, estas muestras fueron vistas en el microscopio de fluorescencia Invitrogen™ EVOS™ M5000 Imaging System los días 1, 4 y 7.

4.3.2.6 Ensayo de adhesión celular de las estructuras impresas CNF:PVA

Se realizó el ensayo de proliferación a través de una colaboración con el Centro Nacional de Biotecnología (CENIBIOT). Para evaluar la adhesión celular, se sembraron 10000 células fibroblastos embrionarias de ratón NIH/3T3 sobre la membrana. Posteriormente, las células fueron fijadas con glutaraldehído, sometidas a un gradiente de etanol, secadas y recubiertas con una capa de oro para su visualización en el microscopio electrónico de barrido (SEM).

CAPITULO V: Resultados y discusión

5.1 Caracterización del rastrojo de piña orgánico

Para comprender la matriz de la hoja de piña que se utilizó como materia prima para las nanofibras de celulosa (CNF), se realizó una caracterización química del material de partida. Las matrices fibrosas se componen principalmente de celulosa, lignina y hemicelulosas, además de la presencia de cenizas, así como otros compuestos que son extraíbles en agua y en disolventes orgánicos.

Cuadro 1. Determinación de la composición química de las fibras de rastrojo de piña (PALF)

Lignina (%)	Holo-celulosa (%)	Extraíbles Acetona /EtOH (%)	Extraíbles Agua (%)	Cenizas (%)
14,08±0,26	89,37±9,73	3,55±0,74	5,71±0,26	8,688±0,052

En el presente estudio, se utilizó rastrojo de piña obtenida de la zona de San Carlos de cultivo orgánico de esta fruta, cuyo contenido principal es holocelulosa y lignina (Cuadro 1). En el Cuadro 1, se observan también los resultados de extraíbles en acetona/etanol y agua y el contenido de cenizas del PALF. Esta matriz del rastrojo de piña orgánica es una matriz baja en lignina, cenizas y sustancias extraíbles con una composición mayoritaria de holocelulosa. Su alto contenido de holocelulosa indica que el PALF tiene un potencial para la extracción de celulosa y por ende de nanocelulosa. También se demuestra el potencial del PALF orgánico como fuente de nanocelulosa para aplicación en un biomaterial, ya que en las extracciones llevadas a cabo los contenidos de material inorgánico (cenizas), extraíbles y lignina se separan de la fibra de celulosa efectivamente, dejando un material con alto contenido de celulosa.

El valor reportado en la literatura de contenido de celulosa de la hoja de piña es de 80-83%.¹⁰³ Previos estudios en Costa Rica, han demostrado un contenido de holocelulosa, lignina, cenizas y extraíbles en agua de 62,75%, 25,63%, 4,64% y 38,5%, respectivamente, para rastrojo de piña obtenido en la zona de Alajuela de la empresa Inprotsa, cultivado con ayuda de plaguicidas.¹⁰⁴

Basado en la literatura, la muestra de rastrojo de piña orgánica posee un contenido de holocelulosa significativamente mayor a otras muestras de rastrojo de piña de cultivo tradicional en Costa Rica.¹⁰¹ El contenido de extraíbles en agua de la hoja de piña orgánica es significativamente menor y el contenido de cenizas es ligeramente mayor a las muestras de rastrojo de piña estudiadas anteriormente en el país.¹⁰⁴ Estas diferencias pueden ser debido al no uso de herbicidas, plaguicidas y diferencia en nutrientes entre los rastrojos de piña estudiados en la literatura y el presente estudio. Ya que según la literatura, el uso de herbicidas inhibidores del fotosistema II, puede afectar otros procesos vegetales como la biosíntesis de carotenoides y la síntesis de antocianinas, ARN y proteínas.¹⁰⁵

5.2 Obtención de las nanofibras de celulosa de rastrojo de piña

Inicialmente, se realizó el proceso de obtención de nanofibras de celulosa a partir del rastrojo de piña orgánica. Esto se inició con la muestra de rastrojo de piña, que fue previamente decorticada mediante un proceso mecánico que expuso la parte fibrilar de la hoja. Esto permitió procesar más fácilmente la fibra de piña por los métodos químicos consiguientes. Posteriormente, se procesó por un pulpeo químico a la sosa y a la fibra obtenida en el pulpeo químico se le realizó un blanqueamiento con hipoclorito de sodio. El flujo de proceso llevado a cabo desde el residuos a la nanocelulosa se presenta en la Figura 5.



Figura 5. Proceso de Obtención de las nanofibras de celulosa oxidadas con TEMPO (CNF) a partir del rastrojo de piña orgánica (Elaboración Propia)

Al obtener la fibra de celulosa blanqueada, se realizó una oxidación mediada por reactivo TEMPO a una proporción de NaOCl de 10 mmol/g fibra por 4 horas a pH 10. Este proceso se realizó con el fin de oxidar el grupo hidroxilo del carbono 6 de la cadena de celulosa hasta convertirlo en grupo carboxilato. Este pretratamiento permite reducir el tamaño de la fibra de celulosa como un pretratamiento a la degradación mecánica, además

de modificarla químicamente, con el fin de incorporar grupos con carga que faciliten la desintegración mecánica para llegar a un tamaño nanométrico de la celulosa.

Posterior a la oxidación mediada por TEMPO, se procedió a desintegrar mecánicamente la muestra en el homogeneizador de alta presión, aplicando dos pases. Al finalizar la desintegración mecánica, se obtuvo un gel semitransparente de aspecto viscoso mostrado en la imagen de la Figura 4, el cual corresponde a la CNF de piña orgánica.

5.3 Caracterización de las nanofibras de celulosa

5.3.1 Espectroscopia infrarroja por transformada Fourier (FTIR)

Al obtener la CNF de piña orgánica, se realizó un análisis infrarrojo de la fibra de hoja de piña (PALF), la celulosa no blanqueada (Celulosa NB), la celulosa blanqueada (Celulosa) y las CNF, mostrado en la Figura 6.

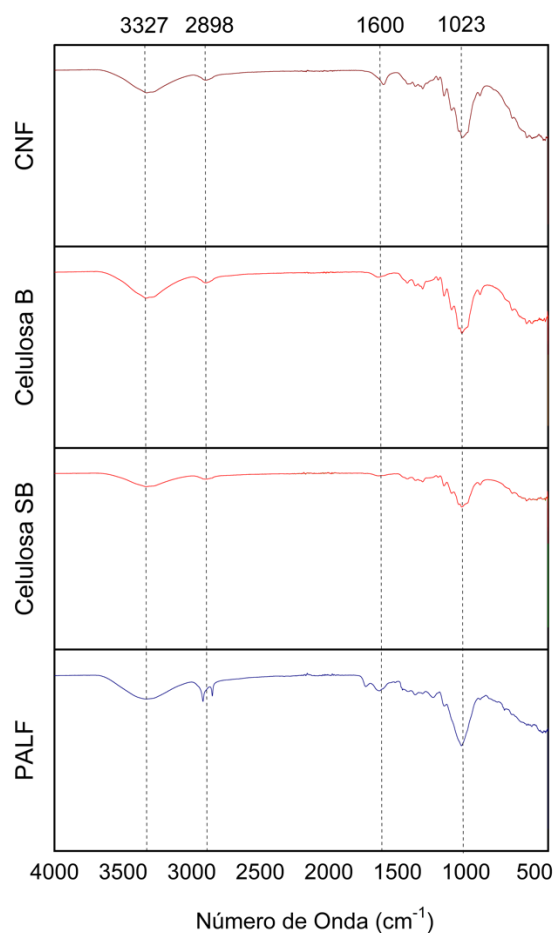


Figura 6. Espectro Infrarrojo (FTIR) de los materiales celulósicos: PALF, Celulosa NB (No Blanqueada), Celulosa B (Blanqueada) y CNF

En todos los espectros, se observaron señales características de material celulósico: (OH: 3327 cm^{-1}), (CH: 2898 cm^{-1}), (C=O, CC y CO: 1159 y 1023 cm^{-1}) y (COC: 897 cm^{-1}). Además, se observa la presencia de un pico alrededor de 1605 cm^{-1} en el espectro de la PALF, el cual se relaciona a la presencia de lignina en la hoja de piña. Este pico de 1605 cm^{-1} se disminuye significativamente en los espectros de celulosa no blanqueada y blanqueada, lo cual comprueba la remoción de la lignina de la PALF mediante el pulpeo químico y el blanqueamiento. La remoción de ligninas es importante porque al ser la lignina un polímero compuesto de estructuras polifenólicas, su presencia en la CNF podría aumentar la citotoxicidad de la misma.

En el análisis FTIR correspondiente a las CNF de piña, aparece una banda nueva en 1600 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento vibracional de los grupos carboxilo. Esto sugiere que los grupos hidroximetil de la unidad de D-glucosa fueron convertidos exitosamente en grupos carboxilo, demostrando que si se está llevando a cabo exitosamente la oxidación por TEMPO. Este resultado concuerda con lo demostrado en la literatura para nanofibras de celulosa oxidadas por TEMPO.¹⁰⁶

5.3.2 Determinación del zeta-potencial y tamaño de nanofibras de celulosa

Para comprobar que hubo una oxidación exitosa en la fibra de celulosa, fue necesario realizar un análisis por DLS para determinar el zeta-potencial de la CNF. Además de esto, se realizó una titulación conductimétrica para determinar el contenido de carboxilato de la muestra.

Los resultados de zeta potencial y el contenido de carboxilatos de la CNF de piña orgánica obtenidos fueron de $-(84,03\pm 0,66)\text{mV}$ y $(1,07\pm 0,02)\text{mmol/g}$, respectivamente. El zeta potencial negativo de las CNF se relaciona con la presencia de grupos carboxilatos en la superficie de las nanofibras, que a un pH 7 se encuentran desprotonados. La presencia de carboxilatos fue confirmada por el valor obtenido en la titulación conductimétrica, estos resultados confirman que se llevó a cabo la oxidación con TEMPO exitosamente.

En la literatura, se han reportado valores de z-potencial de -41 mV para CNF blanqueada obtenida de rastrojo de piña.⁹ Sin embargo, el presente estudio aplica un mayor nivel de oxidación por TEMPO (10 mmol/g) que lo reportado previamente en la literatura, por lo que hay mayor presencia de grupos carboxilato en la CNF obtenida. Esto explica la

carga más negativa obtenida en la CNF del presente estudio, lo cual corresponde con el mayor contenido de carboxilatos obtenido.

Cabe destacar que el tratamiento realizado a la fibra de piña fue realizado con un grado de oxidante (mmol NaOCl/g de fibra) usualmente utilizado para la madera.⁹⁴ El valor elevado de zeta-potencial obtenido para las nanofibras podría reflejar que este tratamiento fue más agresivo que los usualmente utilizados para matrices de piña citados previamente. El tratamiento de oxidación utilizado del presente estudio es normalmente el que es aplicado para tratar fibras de madera, donde es más difícil exponer la fibra de celulosa y se requiere un grado de oxidante mayor debido a que la madera es una matriz más cristalina y lignificada. Sin embargo, para la fibra de piña este tratamiento fue más fuerte y generó una mayor oxidación en la superficie de la fibra, ya que la matriz de piña es menos lignificada y cristalina que la madera.

Con el propósito de analizar el tamaño de las CNF también se realizaron mediciones en el equipo de difracción láser por SLS, el cual permite un rango de medición mayor (10 nm a 3,5 mm) que el DLS, los resultados se presentan en el Cuadro 2.

La técnica SLS se diferencia en la técnica DLS, ya que utiliza luz estática en un rango de medición fijo. Esto permita generar un resultado de distribución de tamaño de partícula y medir a un tamaño en escala nanométrica y micrométrica, mientras que DLS solo reporta un valor de tamaño de partícula.¹⁰⁷ Debido a esto, esta técnica es más acertada a la hora de determinar el rango de tamaño de las nanofibras de celulosa que el DLS, ya que se espera tener una ligera variación en el tamaño de las mismas.

Cabe destacar que ambas técnicas de DLS y SLS se basan en difracción de luz, lo cual es una técnica desarrollada para medir partículas esféricas. Esto permite determinar un valor aproximado del tamaño de partícula de la sustancia en suspensión, pero no un valor exacto.

Cuadro 2. Distribuciones de tamaño de las nanofibras de piña medido en un equipo analizador de tamaño de partículas por difracción láser (SLS)

Muestra	Dx(90) (μm)	Dx(50) (μm)	Dx(10)
---------	--------------------------	--------------------------	--------

CNF	0,479	0,280	0,191
-----	-------	-------	-------

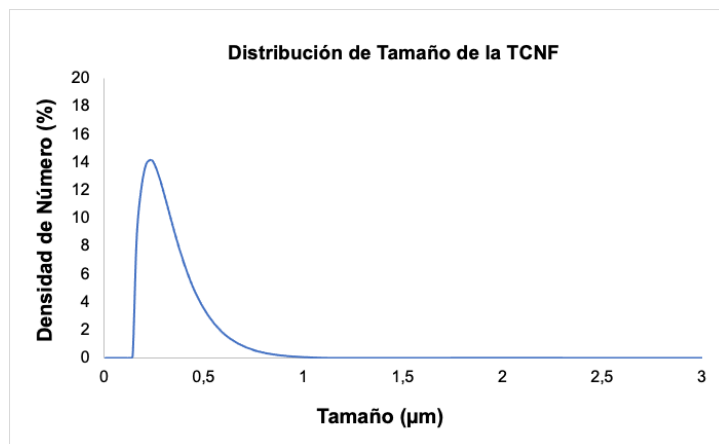


Figura 7. Gráfico de distribución de tamaño de las nanofibras de celulosa medidas en el analizador de tamaño de partículas por difracción láser (SLS)

En el Cuadro 2, se observan los valores de distribución media del tamaño de partículas de las CNF donde se observa un valor de distribución de media del 90% [Dx (90)] de 0,479 μm , con presencia de partículas de 280 nm y 191 nm. También se pudo observar la distribución de porcentaje de número de partículas en función de la clase de tamaño (Figura 7). Estos resultados demuestran que hay una variedad de tamaños en las nanofibras obtenidas, que van desde un rango de alrededor de 200 nm hasta 900 nm, con un promedio de tamaño de 479 nm. Esta variedad de tamaño puede ser debido a la presencia de aglomeraciones de las nanofibras en medio acuoso, generando conjuntos de fibras de tamaño variado.

5.3.3 Morfología de las nanofibras de celulosa por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Para estudiar la morfología de la CNF, fue necesario realizar imágenes por microscopía de fuerza atómica y microscopía electrónica de transmisión, cuyos resultados se presentan a continuación. Las propiedades morfológicas de las nanofibras de celulosa son importantes y pueden influir en el comportamiento reológico de los hidrogeles de las mismas y su comportamiento durante la impresión 3D.

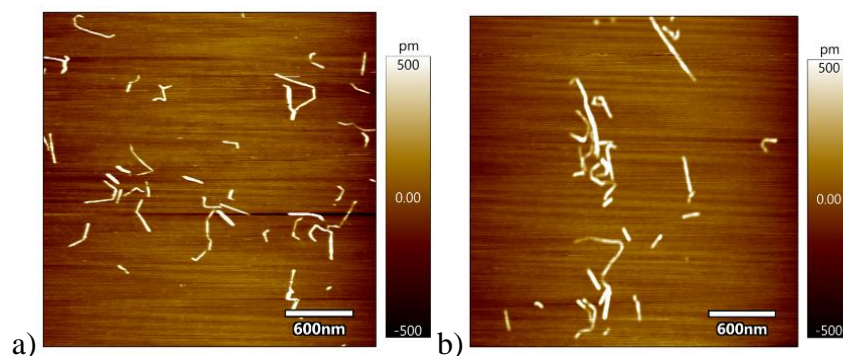


Figura 8. Imágenes AFM para la determinación de la morfología de la CNF de piña: (a y b)
Imágenes AFM

Cuadro 3. Determinación del tamaño promedio y la relación de aspecto de la CNF mediante imágenes de AFM

Muestra	Longitud (nm)	Ancho (nm)	Relación de Aspecto (L/A)
CNF	280 ± 139	$28,4 \pm 7,2$	9,86

Para observar la morfología de las nanofibras de celulosa, se realizaron imágenes de AFM de las mismas, donde se observa una longitud y ancho promedio de 280 ± 139 nm y $28,4 \pm 7,2$ nm, respectivamente (ver Cuadro 3). Se obtuvo una relación de aspecto de 9,86, el cual es significativamente menor al encontrado para CNF obtenido de PALF anteriormente y menor el rango reportado para madera.^{9,109}

Cabe destacar que también se observan pliegues en algunas de las nanofibras (Fig. 8 y 9), lo cual puede ser debido a la desintegración mecánica que se someten las mismas mediante el homogeneizador de alta presión (Microfluidics). Por otro lado, se pudieron observar en las imágenes aglomeraciones de las nanofibras (Fig. 8b). Estas imágenes muestran la variedad de tamaños y las aglomeraciones que hay en la muestra de CNF que

podieron llevar a la observación de cuerpos de nanofibras de tamaño hasta los 900 nm en el análisis de tamaño en medio acuoso realizado por la técnica de difracción láser.

Los resultados de longitud de nanofibras obtenidas están en un rango similar al encontrado en muestras de CNF de PALF obtenidas por explosión de vapor.¹¹⁰ Sin embargo, los tamaños de la CNF del presente estudio poseen una relación de aspecto menor a muestras de CNF obtenidas de rastrojo de piña en Costa Rica anteriormente.³⁴ Esto puede ser debido a diferencias en el tratamiento químico y mecánico que llevaron las muestras. Especialmente, el mayor grado de oxidación que lleva la CNF del presente estudio es la razón por la cual se observa una menor relación de aspecto que en investigaciones pasadas con nanofibras extraídas de PALF, ya que este pretratamiento es el encargado de exponer las fibras de celulosa y reducir su tamaño inicialmente.

La relación de aspecto también es importante en el contexto de la impresión 3D, ya que influye en las propiedades reológicas de las nanofibras de celulosa en suspensión acuosa. En la literatura, se ha demostrado que hay tres factores que influyen en la reología de las suspensiones de nanofibras: la concentración, la cantidad de aglomeraciones y la relación de aspecto. En específico, se detalla que al incrementar la relación de aspecto de las nanofibras, la viscosidad intrínseca de la suspensión aumenta.¹⁰⁸

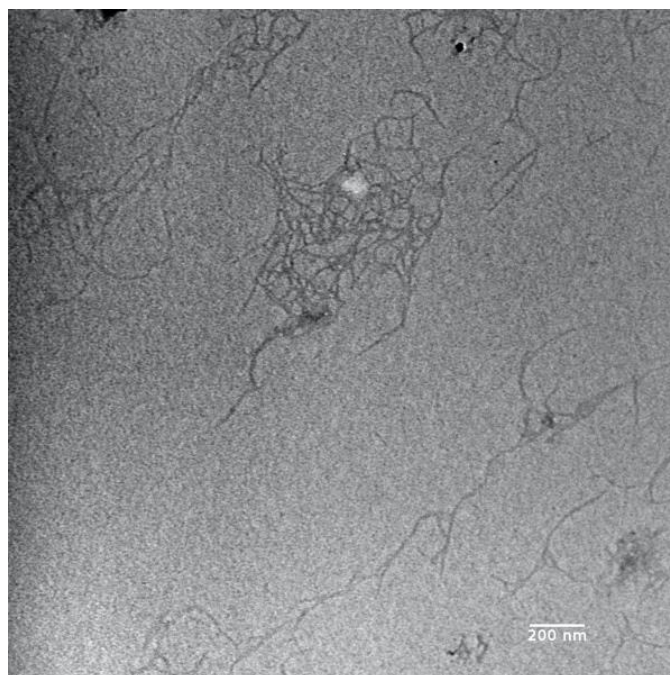


Figura 9. Imágenes TEM de las nanofibras de celulosa

Posteriormente, se obtuvieron imágenes TEM para conocer la morfología de la celulosa, demostradas en la Figura 9. Se observó un ancho en las CNF de $38,3 \pm 9,4$ nm, lo cual difiere por 10 nm a lo medido por AFM. Esta diferencia podría ser debido a que el tipo de medición por "tapping" que se realiza en AFM tiene una tolerancia asociada, igual al tamaño de la punta del cantiléver utilizada.

Cabe destacar que se observó aglomeración de las nanofibras de celulosa, por lo que se decidió no medir la longitud de las nanofibras utilizando las micrografías TEM, pero se puede estimar que la longitud de las nanofibras es de varios micrómetros. En estas imágenes también se observan pliegues en las fibras, similar a lo observado en las imágenes AFM.

La presencia de pliegues y conglomeraciones es similar a lo reportado en muestras de CNF preparados a partir de pulpa de madera por oxidación TEMPO y tratamiento mecánico.¹¹⁰ Según la literatura, se encuentra la presencia de pliegues de manera universal en las nanofibras de celulosa después de realizar un tratamiento mecánico para su desintegración o disminución de tamaño.¹¹¹

Es importante resaltar que las técnicas SLS, TEM y AFM pueden generar diferencias en medición de tamaño por sus mecanismos de medición. Primeramente, la técnica SLS se diferencia en la microscopía TEM Y AFM en que el tamaño de partícula se mide en medio acuoso, lo cual por la hidratación de la partícula puede dar resultados de tamaño mayores a aquellos medidos por microscopía. Como mencionado anteriormente, la técnica SLS asume que la partícula es esférica, por lo que, esta medición permite estimar el tamaño de las nanofibras pero no es un valor exacto.

Las técnicas TEM y AFM permiten medir la partícula en un medio plano y seco y, al ser técnicas de microscopía, dan una imagen que permite ver la morfología de las partículas. En este caso con las nanofibras, permiten visualizar y cuantificar la longitud y ancho de las mismas. Por lo tanto, estas técnicas nos dan más información sobre el aspecto y tamaño de las nanofibras en un medio seco y cuál es su naturaleza morfológica.

Entre sí, estas técnicas de microscopía se diferencian en que el TEM utiliza un haz de electrones incidido sobre la muestra para dar una imagen microscópica de las nanofibras y el AFM utiliza un "cantilever" que hace un barrido topográfico y mide la amplitud generada por la superficie de la muestra en el "cantiléver". Ambas técnicas son utilizadas para medir longitud y ancho de nanofibras de celulosa, sin embargo, el AFM puede tener una tolerancia

asociada en cuanto a la medición de ancho de fibra, ya que se basa en el uso de otro cuerpo de referencia (en este caso el “cantiléver”) para hacer el barrido topográfico y generar la imagen microscópica.

Adicionalmente, a los materiales se les realizó difracción de rayos X para estudiar su cristalinidad, los datos de I_c se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Índice de cristalinidad de la PALF, la celulosa sin blanquear (SB), la celulosa blanqueada (B) y la CNF

Muestra	Índice de cristalinidad (%)
PALF	59
Celulosa SB	64
Celulosa B	66
CNF	46

De acuerdo a los resultados, se determinó un índice de cristalinidad de CNF de 46%. Se observó una disminución de la cristalinidad en la CNF en comparación con la celulosa blanqueada, la celulosa no blanqueada y la PALF (ver Cuadro 4) lo cual pudo haber sido por una degradación de la estructura cristalina debido a que el tratamiento químico realizado fue más fuerte que lo trabajado anteriormente para CNF de piña.

Se evidencia un incremento de la cristalinidad al realizar los procesos de pulpeo y blanqueo químico de la PALF, posteriormente para la CNF se observa una disminución de la cristalinidad, esto se puede deber a que durante el proceso de fibrilación mecánica se pierdan además de zonas amorfas, zonas cristalinas del material, ya que como se sabe las nanofibras conservan ambos tipos de estructuras, las amorfas y las cristalinas, a diferencia de los nanocristales donde se preservan mayormente las cristalinas.³⁴

5.3.4 Determinación de las propiedades térmicas de las nanofibras de celulosa por análisis termogravimétrico (TGA)

Posterior a la determinación de las características morfológicas de las nanofibras, se procedió a determinar la estabilidad térmica de la CNF y los materiales de partida mediante análisis termogravimétrico (Figura 10).

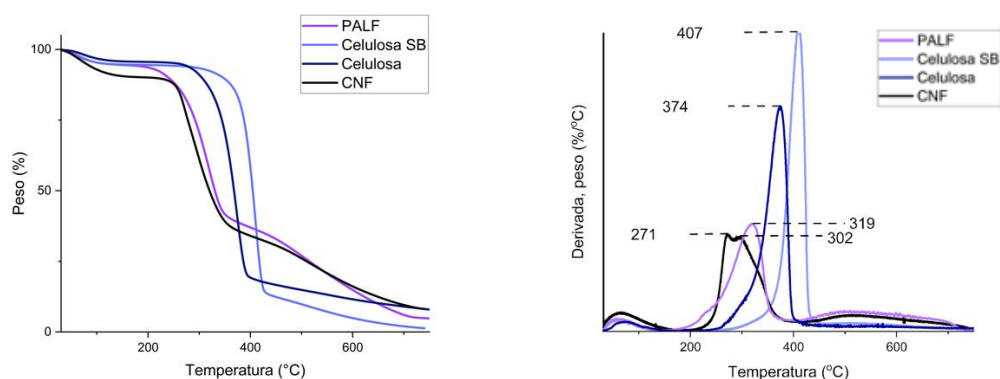


Figura 10. Termogramas y derivatogramas de: la PALF, la celulosa sin blanquear (Celulosa SB), la celulosa blanqueada (Celulosa B) y la CNF

Cuadro 5. Datos de TGA de la obtención de las nanofibras de celulosa de piña

Muestra	T _{degradación inicial} (°C)	T _{degradación final} (°C)	DTG T ₁ max (°C)	DTG T ₂ max (°C)	% de masa residual a 600 °C
PALF	178	400	319	-	14,6
Celulosa SB	279	452	407	-	4,8
Celulosa B	254	418	374	-	11,6
CNF	201	405	271	302	16,0

Primeramente, se determinó una temperatura de degradación inicial de la PALF (178°C), la cual es menor a la T_{deg} de la celulosa blanqueada y sin blanquear debido a la hemicelulosa y lignina presentes en la matriz. Las hemicelulosas están compuestas por azúcares simples que forman una estructura amorfa ramificada, la cual es fácilmente degradada a bajas temperaturas. Por otro lado, la lignina se degrada de manera lenta iniciando a los 160°C y terminando a los 400°C. La DTG dominante de la PALF fue a 319°C, correspondiente a la pirólisis de la celulosa que ocurre alrededor de los 315°C. Por último, su temperatura de degradación final (400°C) está al límite del rango de degradación de las fibras celulósicas. La masa residual a 600°C se considera que podría contener lignina además de cenizas, esto último concuerda con lo demostrado en la literatura anteriormente.¹¹²

Para la celulosa sin blanquear, se observó una temperatura de degradación inicial de 279°C, la cual está dentro del rango de descomposición de la celulosa que ocurre de 260-350°C según la literatura.¹¹³ La DTG dominante de la celulosa sin blanquear fue de 407°C, cuyo mayor valor podría atribuirse a la lignina todavía presente en la matriz, así como las hemicelulosas removidas en el proceso de pulpeo químico de la PALF. El porcentaje de masa residual a 600°C fue de 4,8%, evidenciando la presencia de materiales inorgánicos o que no se descomponen a 600°C.

Posteriormente, se determinó la temperatura de degradación inicial de la celulosa blanqueada (254°C), la cual está en el rango de descomposición de la celulosa reportado en la literatura.¹¹³ Su menor valor en comparación con la celulosa sin blanquear puede ser debido a la mayor remoción de lignina causada por el proceso de blanqueamiento de la fibra. Se encontró una DTG dominante de 374°C, lo cual puede indicar la presencia de otro material debido a que se sale del rango de descomposición de celulosa. La temperatura final de degradación fue de 418°C. El valor de masa residual a 600°C fue de 11,6%, lo cual indica una mayor presencia de material inorgánico en la fibra de celulosa.

En la Figura 10, se observa que las nanofibras presentaron una temperatura de degradación inicial de 201°C. La primera DTG dominante tuvo un valor de 271 °C. Además, apareció una segunda DTG dominante con un valor de 302°C, lo cual se debe a la formación de unidades anhidroglucuronato de sodio durante la oxidación mediada por TEMPO. Estas unidades anhidroglucuronato de sodio poseen menor estabilidad térmica y menor temperatura de degradación que las cadenas de celobiosa y como se ha reportado en la

literatura la oxidación por TEMPO se da de manera superficial en las fibras de celulosa, lo que genera dos fases en la celulosa una oxidada y otra sin oxidar, generando dos picos en el TGA.¹¹⁴ La temperatura de degradación final fue de 405°C, además, el porcentaje de masa residual a 600°C fue de 16,0%, lo cual indica la presencia de material inorgánico. Este valor elevado de material inorgánico es debido al contenido de minerales presentes en la hoja de piña. Un análisis a la hoja de piña de la zona de San Carlos de Costa Rica, que no fue tratada con herbicidas, demostró un contenido significativo de potasio (207,8mg/100mg hoja), magnesio (18,8 mg/100 mg hoja), hierro (7,5mg/100mg hoja) y rastros de níquel, zinc, cobre y cobalto.¹¹⁵

5.4 Creación de la biotinta de nanofibras de celulosa de rastrojo de piña y alcohol polivinílico

Posterior a la caracterización de las nanofibras de celulosa, se procedió a formar un hidrogel compuesto de las mismas. De manera inicial, se trabajó probando mezclas de CNF con alginato, sin embargo, no se pudo encontrar durante el inicio de la pasantía una formulación que permitía generar un hidrogel que mantuviera una estructura estable post-impresión. En este caso, después de probar distintos materiales durante la pasantía, se decidió utilizar una mezcla de CNF y alcohol polivinílico (PVA) en diferentes proporciones. En esta mezcla, bajo ciertas condiciones se da un entrecruzamiento entre los materiales, lo que puede contribuir a la estabilidad del hidrogel para ser empleado en bioimpresión. El entrecruzamiento entre el PVA y la CNF se da gracias a los grupos carboxilato que poseen las CNF, ya que estos grupos permiten el entrecruzamiento con el PVA mediante una esterificación en un medio ligeramente ácido. Al mezclar las CNF y el PVA, el gel, que posee un pH aproximado de 5, debido al PVA) adquiere una mayor viscosidad, lo cual se procedió a estudiar mediante un estudio reológico.

5.4.1 Estudio reológico de las biotintas para impresión 3D de CNF:PVA

Inicialmente, se realizaron 2 mezclas con proporción distinta de ambos materiales (PVA y CNF), las cuales fueron analizadas mediante un estudio reológico.

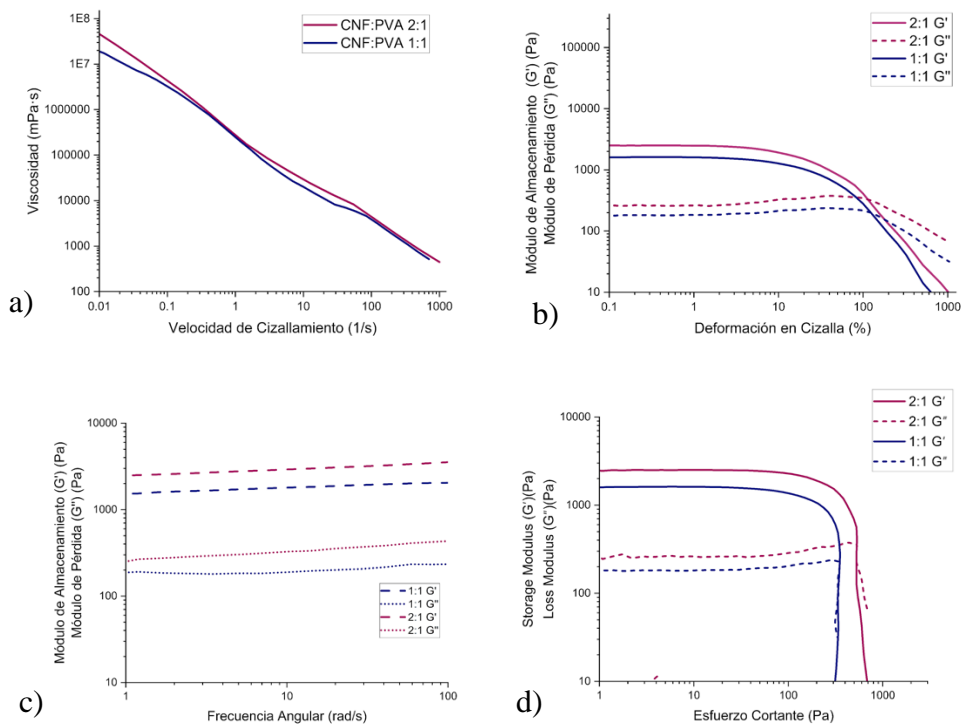


Figura 11. Gráficos de estudio reológico de las muestras CNF:PVA: (a) el comportamiento viscoso en función de la velocidad de cizallamiento, (b) el comportamiento viscoelástico en función de deformación en cizalla, (c) el comportamiento viscoelástico en función de la frecuencia angular y (d) el comportamiento viscoelástico en función del esfuerzo cortante

Durante la impresión por escritura directa con tinta o DIW, se extruye y deposita el material de impresión de manera continua y por capas. Los análisis reológicos realizados de los hidrogeles de CNF:PVA son información importante en el contexto de la impresión 3D por DIW, debido a que la fuerza, la resolución y la fidelidad de la estructura post-impresión del hidrogel son parámetros definidos por las propiedades viscoelásticas del mismo.

En la Fig. 11a, se muestra la viscosidad de los hidrogeles de CNF:PVA en proporción 2:1 y 1:1 en función de la velocidad de cizallamiento a 25°C. Se observó una reducción en viscosidad al incrementar la velocidad de cizallamiento, indicando un comportamiento pseudoplástico para ambos hidrogeles. Esto es relevante en el contexto de la impresión 3D en DIW (Direct ink writing), ya que demuestra que al aplicar mayor fuerza de cizalla, los hidrogeles disminuyen en viscosidad y permiten un mayor flujo del material durante la impresión, sin obstruir el paso de la boquilla de impresión.

Al ajustar las curvas de fluido de los hidrogeles de CNF:PVA al modelo de ley de potencia, poseen un K mayor a 1 (ver ecuación 1). Según la literatura, los materiales con comportamiento pseudoplástico poseen un índice de consistencia mayor a 1, por lo que se comprueba que los hidrogeles CNF:PVA poseen un comportamiento pseudoplástico.⁸²

El comportamiento pseudoplástico es favorable para la impresión 3D por extrusión, debido a que el hidrogel puede extruirse sin obstruir la boquilla donde se extruye debido a las velocidades de cizallamiento altas administradas durante la impresión 3D. Debido a que la viscosidad se recupera después de remover la fuerza de cizalla, la forma del hidrogel puede ser conservada después de su deposición sin deformación.

Para el presente estudio, se puede observar un aumento de viscosidad al aumentar el contenido de CNF en los hidrogeles, sin embargo, el valor de n calculado para la ecuación 1 no fue afectada por el aumento de contenido de CNF, lo cual podría indicar que el aumento de la CNF no incrementa significativamente la pseudoplasticidad de los hidrogeles.

Los resultados reportados en la literatura fueron similares, donde se ha observado que el comportamiento pseudoplástico de los hidrogeles CNF:PVA está proporcionado por la incorporación de CNF en las mismas al comparar el ensayo de la biotinta con el del PVA al 10% que utilizaron como reactivo.¹³

Posteriormente, los hidrogeles fueron sometidos a un movimiento oscilatorio incrementado a una frecuencia constante de 10 rad/s para cuantificar el comportamiento del rango lineal viscoelástico. La Figura 11b presenta la tendencia de G' y G'' versus la deformación de cizalla a 25°C. Las curvas de ambos módulos fueron planas a deformación baja (menor que 1% de deformación, aproximadamente), por lo que la amplitud de 0,1% fue considerada el rango viscoelástico lineal de los hidrogeles. Se observa que la G' es mayor a la G'' en el rango lineal, por lo que se demuestra que los hidrogeles son materiales sólidos viscoelásticos.⁸²

Además, el límite donde la transición entre el rango lineal y no lineal ocurre se reduce ligeramente al incrementar el contenido de CNF. Esto puede indicar la formación de una estructura robusta, como se ha demostrado anteriormente en la literatura en materiales compuestos de CNF y PVA.^{13,116} Cuando la amplitud de deformación sobrepasó 1%, la curva de G' disminuyó mientras que la de G'' incrementó muy ligeramente. Al incrementar la deformación, G'' dominó sobre el G' para todos los hidrogeles, indicando un punto de

máximo caudal debido al ceder y fallar de la estructura de la red polimérica. Por lo tanto, la estructura de la red empezó a comportarse como un fluido no-Newtoniano pseudoplástico.

Se realizaron análisis de frecuencia en el rango de 1-100 rad/s a una deformación de 0,1% para evaluar la fortaleza de los hidrogeles, los cuales se presentan en la Fig. 10c. Para todos los hidrogeles, G' fue mayor a G'' , lo cual se demuestra con los factores de pérdida (o $\tan(\delta)$)(ver Figura 18 de anexos) bajos para ambos geles. Estos valores de factor de pérdida muestran el comportamiento tipo sólido del material como el dominante y que están en un rango aceptable para impresión 3D según la literatura.^{13,116} Además, ambos G' y G'' incrementaron al aumentar cantidad de CNF, demostrando el efecto de refuerzo de la nanocelulosa. Se ha reportado que los enredamientos de las nanofibras de celulosa también pueden ser una razón de este aumento en la fuerza.¹¹⁷

El comportamiento de módulo de pérdida y almacenamiento fue estudiado en función del esfuerzo cortante (Figura 11d). El límite elástico fue determinado de la intersección de G' y G'' . A valores de esfuerzo bajas, los geles tuvieron un valor de G' fueron mayores que G'' . Según la literatura, esto indica que los hidrogeles mantienen la estabilidad suficiente para mantener su estructura dentro de la boquilla de impresión 3D antes de la aplicación de una presión externa.¹¹⁸

Cuadro 6. Determinación del límite elástico de los hidrogeles CNF:PVA a partir del comportamiento viscoelástico en función del esfuerzo cortante

Muestra	Límite Elástico (τ)(Pa)
CNF:PVA 2:1	351
CNF:PVA 1:1	248

Al aplicar mayor esfuerzo cortante por encima del rango viscoelástico lineal se alcanza el límite elástico (τ) de los hidrogeles. Los valores obtenidos de τ se observan en el Cuadro 6, donde se observa un incremento en el valor del τ al aumentar la cantidad de CNF. El incremento de valor de τ al aumentar CNF, demuestra que las nanofibras proporcionan la resistencia al flujo al aplicar un esfuerzo cortante. Esto podría ocurrir debido a que a mayor cantidad de CNF, se incrementan las conglomeraciones del mismo y generan una red intermolecular que requiere mayor esfuerzo para alinearse y fluir.










Para el diámetro de boquilla a utilizarse en la impresora 3D (0,84 mm), se calculó un límite elástico máximo alcanzado dentro de la boquilla de 529 Pa (τ_{\max}), según la ecuación 2, para estudiar la fluidez de las biotintas bajo las condiciones de impresión. τ_{\max} se calculó mediante la ecuación 2, tomando en cuenta el ΔP la presión máxima aplicada (40×10^3 Pa), el radio ($840,0 \times 10^{-6}$) y la longitud (3,175) de la boquilla de impresión.

El τ_{\max} que puede alcanzar la impresora es significativamente mayor a los límites elásticos de los hidrogeles CNF:PVA. Esto demuestra que la presión neumática que mantiene la impresora es suficientemente alta para sobrepasar el límite elástico de los hidrogeles, por lo tanto la red intermolecular puede alinearse y salir por la boquilla de impresión 3D.¹³

5.4.2 Impresión 3D de las biotintas de impresión 3D

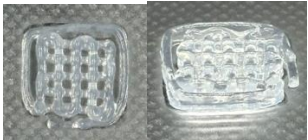

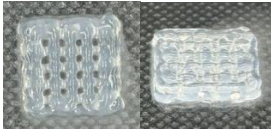


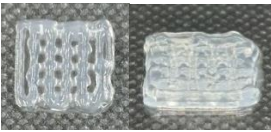


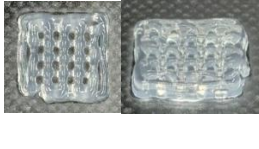
Al ser materiales con alto contenido de agua, los hidrogeles pueden ser inestables y tender a colapsar a la hora de realizar la impresión 3D.¹³ Por esto mismo, se realizaron ensayos de impresión 3D para ambos hidrogeles a distintas presiones y velocidades de impresión.

Cuadro 7. Pruebas de impresión iniciales con CNF:PVA 2:1 a 21°C

Velocidad de impresión (mm/s)	Presión (kPa)		
	125	130	135
9			
10			
11			

Los ensayos de impresión 3D para la biotinta CNF:PVA 2:1 se observan en el Cuadro 7, cuyo rango de presión neumática fue de 125-135 kPa y velocidad de desplazamiento de 9-11 mm/s. Las impresiones con más definición se obtuvieron a 135 kPa y 10 mm/s de velocidad de desplazamiento.

Cuadro 8. Pruebas de impresión 3D iniciales del hidrogel CNF:PVA 1:1 a 21°C

Velocidad de impresión (mm/s)	Presión (kPa)		
	55	60	65
6,5			
7,5			
8,5			

Para la biotinta de CNF:PVA 1:1 se tuvieron impresiones en el rango de 55-65 kPa y 6,5 a 8,5 mm/s, las cuales se muestran en el Cuadro 8. Las impresiones más definidas se obtuvieron a 60 kPa.

Para ambos hidrogeles, solamente se pudo imprimir más arriba de los 40 kPa para los cuales se calculó que se podría sobrepasar el límite elástico. Esto puede ser debido a la presencia de conglomeraciones de CNF de tamaño mayor al diámetro de boquilla que obstruyeran el paso del material.

La biotinta de CNF:PVA 1:1 tuvo mejor capacidad de impresión, ya que en todos los rangos de impresión se obtuvo mejor consistencia que la biotinta de 2:1. Además, se tuvo que utilizar mayor presión con la biotinta de CNF:PVA 2:1, lo que se relaciona con el mayor límite elástico del mismo en comparación con el otro hidrogel (relación 1:1). Por esto, se decidió caracterizar hinchamiento y degradación solamente para las estructuras impresas de CNF:PVA 1:1, debido a que se obtienen estructuras más uniformes y estables a la hora de imprimir.

Al comparar con hidrogeles de CNF:PVA compuestos por nanofibras provenientes de madera de abedul, los hidrogeles del presente estudio requirieron mayor presión a la hora de imprimir.¹³ Esto puede ser debido a las diferencias de preparación y origen de las nanofibras, en dicho estudio se tenía un contenido de carboxilatos de 1,4 mmol/g y se aplicó una mayor cantidad de pases en un desintegrador mecánico para obtener las nanofibras. En el presente estudio la cantidad de grupos carboxilato fue de 1,09 mmol/g y solo 2 pases por un homogeneizador mecánico.

Cuadro 9. Comparación de la impresión del hidrogel CNF:PVA 1:1 a distintas alturas de objeto y su estructura liofilizada


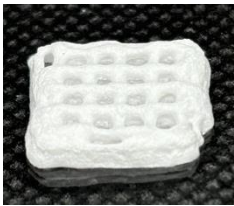




Altura de Objeto (mm)	Imagen de impresión	Estructura liofilizada
2		
4		
5		



Figura 12. Imágenes de la impresión 3D de figuras complejas: el logo de la Universidad Nacional de Costa Rica y una oreja humana impresas en la bioimpresora con la formulación CNF:PVA 1:1

En el Cuadro 9, se demuestra la formación de capas para el hidrogel CNF:PVA 1:1, donde se obtuvieron geometrías con 2, 4 y 5 mm de altura. En la Figura 12, se muestra una impresión 3D del logo de la Universidad Nacional y una oreja humana, lo cual demuestra la resolución que puede tener el hidrogel de CNF:PVA. Esto evidencia que podemos construir estructuras más complejas con mayor altura sin el colapso de la estructura impresa. Esto se debe a la alta viscosidad del gel. La razón por la cual se mantiene la estructura de los hidrogeles tan estable post-impresión es por el entrecruzamiento entre el CNF y el PVA.

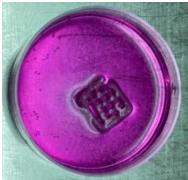

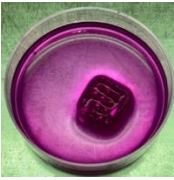
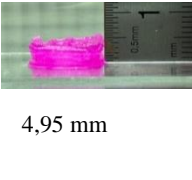
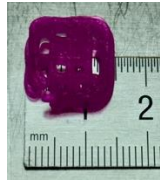



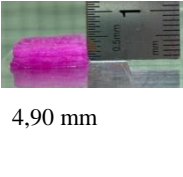
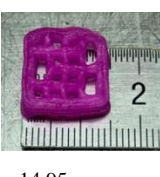
Posterior a la impresión 3D se liofilizaron las muestras impresas, como se observa en el Cuadro 9. Las muestras liofilizadas aparentaban una textura suave y flexible como una espuma, pero se mantenían firmes al aplicar una presión suave. Según la literatura, estas características las puede hacer atractivas para aplicaciones como apósitos de piel o para aplicaciones en medicina regenerativa para tejido fibrocartilaginoso.^{13,119}

5.5 Caracterización de la biotinta de nanofibras de celulosa de rastrojo de piña y alcohol polivinílico

5.5.1 Estudio de degradación de las biotintas impresas de CNF:PVA

Posterior a la impresión 3D, se estudió la degradabilidad del hidrogel de CNF:PVA mediante la incubación a 37°C en cultivo DMEM por 8 días.

Cuadro 10. Determinación de la degradación de los hidrogeles impresos de CNF:PVA 1:1 en cultivo DMEM a 37°C

Repetición	Tiempo de Incubación			Altura de Objeto (Promedio: (4,93±0,04) mm	Ancho de Objeto (Promedio: (14,93±0,04) mm
	6 horas	3 días	8 días		
1				 4,95 mm	 14,90mm
2				 4,90 mm	 14,95mm

En el Cuadro 10, se observan los ensayos de cultivo con DMEM realizados. Para ambas repeticiones, se presenta su aspecto a 6 horas, 3 días y 8 días de incubación, además de su altura y ancho posterior a la incubación. Comparando a su altura y ancho inicial (5 mm y 15 mm), no hubo una pérdida mayoritaria de las dimensiones de la estructura impresa (porcentaje de pérdida de 0,5% de altura y 1,5% de ancho). No hubo colapso de la estructura y hubo poca disminución de la altura después de 8 días de incubación. Esta estabilidad se

debe a la poca biodegradación de materiales de CNF y PVA a condiciones ambientales por su proceso de entrecruzamiento.

Estos resultados se asemejan a los resultados obtenidos para hidrogeles de CNF:PVA impresos y liofilizados citados en la literatura, donde se reporta una pérdida de masa del 3% y el mantenimiento de una estructura estable posterior a su incubación con DMEM.¹³ Al poder mantener integridad estructural, esto demuestra el potencial uso del material impreso de CNF:PVA como biomaterial que tenga contacto prolongado con tejido humano sin desintegrarse rápidamente.

5.5.2 Estudio de hinchamiento de las biotintas impresas de CNF:PVA

La propiedad del hinchamiento es muy importante para la ingeniería de tejidos, ya que permite que se formen estructuras tridimensionales favorables para la infiltración y migración celular.

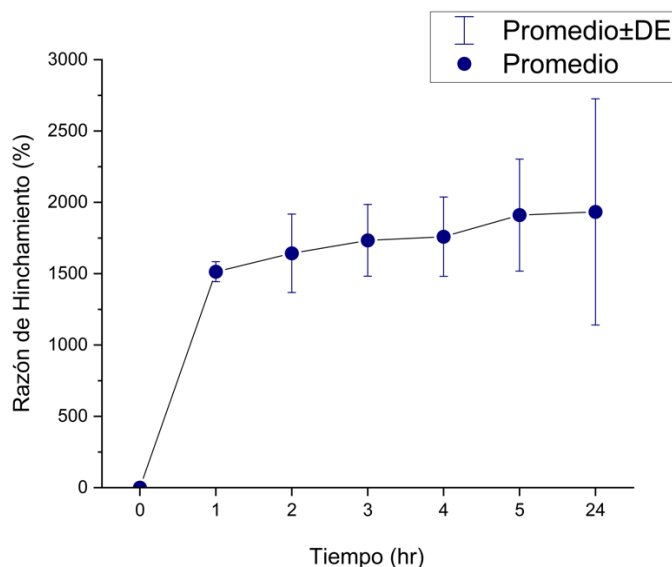


Figura 13. Determinación del promedio del porcentaje de hinchamiento de las estructuras impresas de CNF:PVA 1:1

En la Fig. 13, se observan los resultados de determinación del hinchamiento de las estructuras impresas de CNF:PVA 2:1 durante 24 horas a 37°C . El % de hinchamiento aumentó drásticamente después de 1 hora de incubación y llegó a un plano después de 5 horas de incubación (alcanzando un rango de valor de 1900%). El valor de hinchamiento es relativamente alto y está por encima de los valores citados en la literatura para hidrogeles de

CNF:PVA, ya que en este estudio se alcanzan valores hasta 1614%.¹³ Esta capacidad de hinchamiento se debe a la abundancia de grupos hidroxilo del PVA y CNF que forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, generando el hinchamiento de la estructura. La propiedad de hinchamiento es favorable en los apósitos para curación de heridas, ya que permite mantener humectación en la herida, previene la formación de costras y evita el dolor durante la curación de heridas.¹²⁰ Esto demuestra un potencial del material en una aplicación de apósito de piel, ya que su alto valor de hinchamiento le permitiría cumplir con dichos requisitos.

5.5.3 Evaluación de las porosidad mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La porosidad de los hidrogeles es una propiedad crucial de los materiales para aplicaciones biomédicas.⁸⁹ La porosidad también es sumamente importante para la curación de heridas, ya que permite la permeabilidad del aire a la herida, mientras que un diámetro excesivo de poros permite el ingreso de contaminación bacteriana.⁸⁸

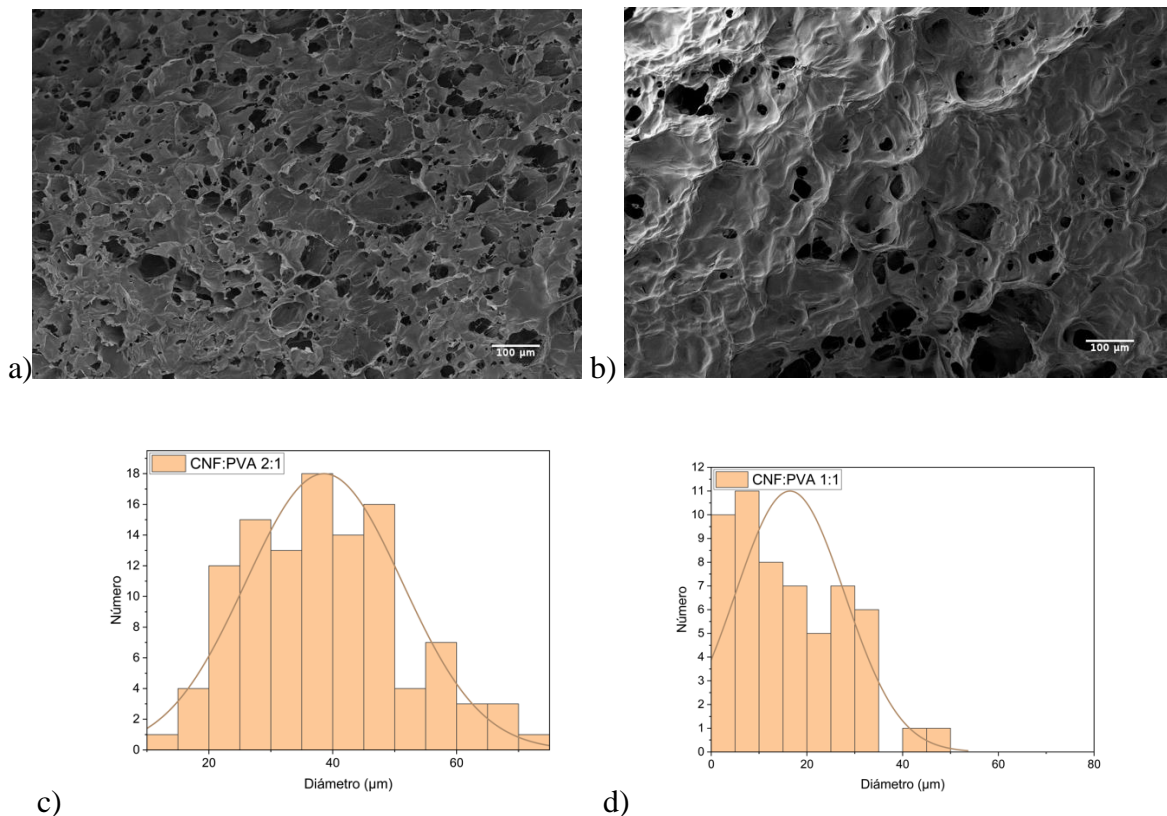


Figura 14. Imágenes SEM de las estructuras impresas de CNF:PVA de formulación a)2:1, b)1:1 y la distribución media de los diámetros de poro c)2:1 y d)1:1

De esta manera, se caracterizó la microestructura de los hidrogeles impresos mediante imágenes SEM, demostradas en la Figura 14. Ambas estructuras impresas de CNF:PVA poseen una estructura porosa, siendo la muestra de CNF:PVA 2:1 la que tiene mayor porosidad en su estructura. Se observó un tamaño de poro con promedio de (39 ± 13) μm y (16 ± 11) μm para los hidrogeles de CNF:PVA 2:1 y 1:1, respectivamente. Los valores del hidrogel impreso de CNF:PVA 2:1 están dentro del rango óptimo de tamaño de poro reportado para el crecimiento celular de células de piel de mamíferos adultos, el cual es de 20-125 μm .¹²¹ El valor del hidrogel impreso de CNF:PVA 1:1 están en el límite inferior del rango óptimo para la proliferación celular, sin embargo, al considerar su desviación estándar sí entrarían en el rango citado.

Cabe destacar que no hubo evidencia del colapso del material, debido al enredamiento de alcohol polivinílico y las nanofibras de celulosa y que el poco encogimiento de la estructura del hidrogel mediante liofilización resultara en mayor fidelidad de la forma del hidrogel. La presencia de una arquitectura porosa con poros interconectados es favorable en hidrogeles para curación de heridas debido a que proporciona una alta área superficial para absorber exudados de heridas y fácilmente intercambiar oxígeno y nutrientes a través de su estructura porosa.¹²² También es de importancia recalcar que no hubo evidencia de agregación de nanofibras de celulosa o la formación de 2 fases en las imágenes SEM, demostrando una dispersión homogénea de la matriz de PVA y CNF. Esto va de acuerdo a lo reportado con materiales similares en la literatura.¹³

5.5.4 Evaluación de la citotoxicidad de las estructuras impresas de CNF:PVA

Para estudiar su potencial como biomaterial, se evaluó la citotoxicidad, proliferación celular y adhesión celular de los lixiviados de las estructuras impresas de CNF:PVA siguiendo la norma ISO 10993-5, que establece los protocolos para pruebas de biocompatibilidad *in vitro*. Para esto, se midió el efecto de las distintas concentraciones de los lixiviados de las estructuras de CNF:PVA sobre la viabilidad celular.

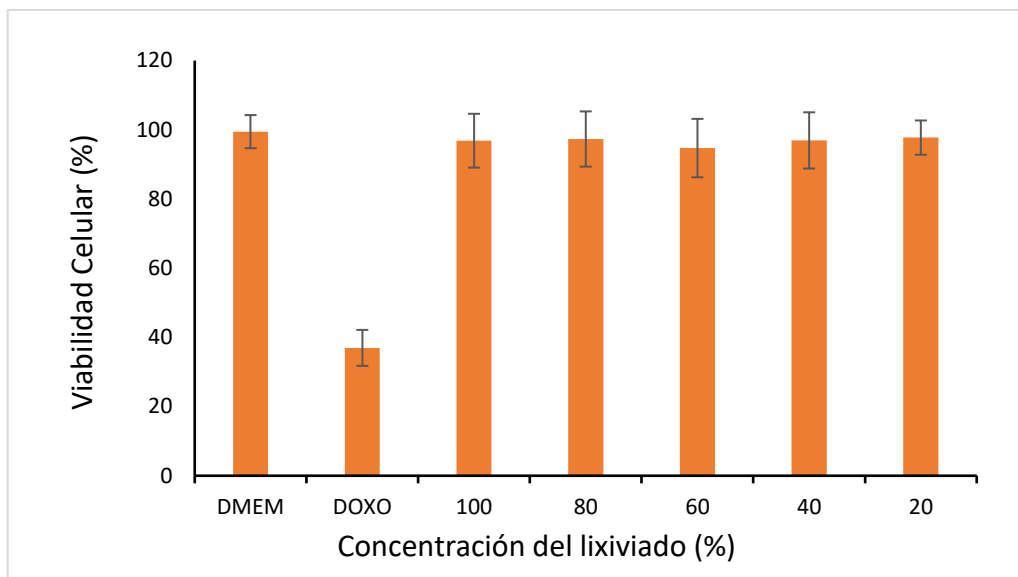


Figura 15. Efecto de los lixiviados de 4 lotes de las estructuras impresas de CNF:PVA 1:1 sobre la viabilidad celular de las células NIH/3T3 24 horas posterior a su exposición. Los resultados fueron normalizados con el grupo control. DMEM: Ctrl positivo (células+medio), Doxo: Ctrl negativo (doxorrubicina)

En la Figura 15, se observan los resultados de viabilidad celular de fibroblastos NIH/3T3 en función de las concentraciones de los lixiviados de las estructuras impresas de CNF:PVA 1:1 (100%, 80%, 60%, 40% y 20%) y dos controles adicionales: DMEM, utilizado como control positivo, y doxorrubicina (Doxo), un fármaco quimioterapéutico tóxico, como control positivo. Además, se puede observar el crecimiento de las fibroblastos en la Figura 15.

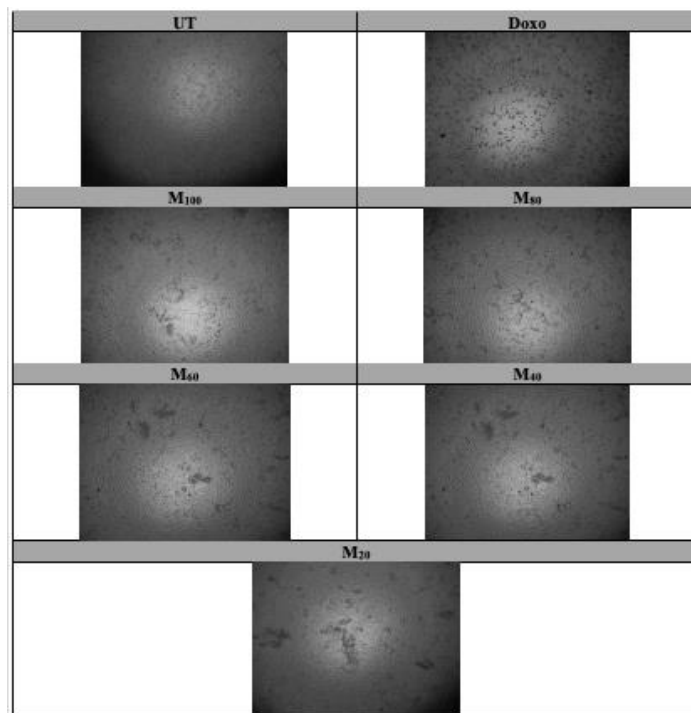


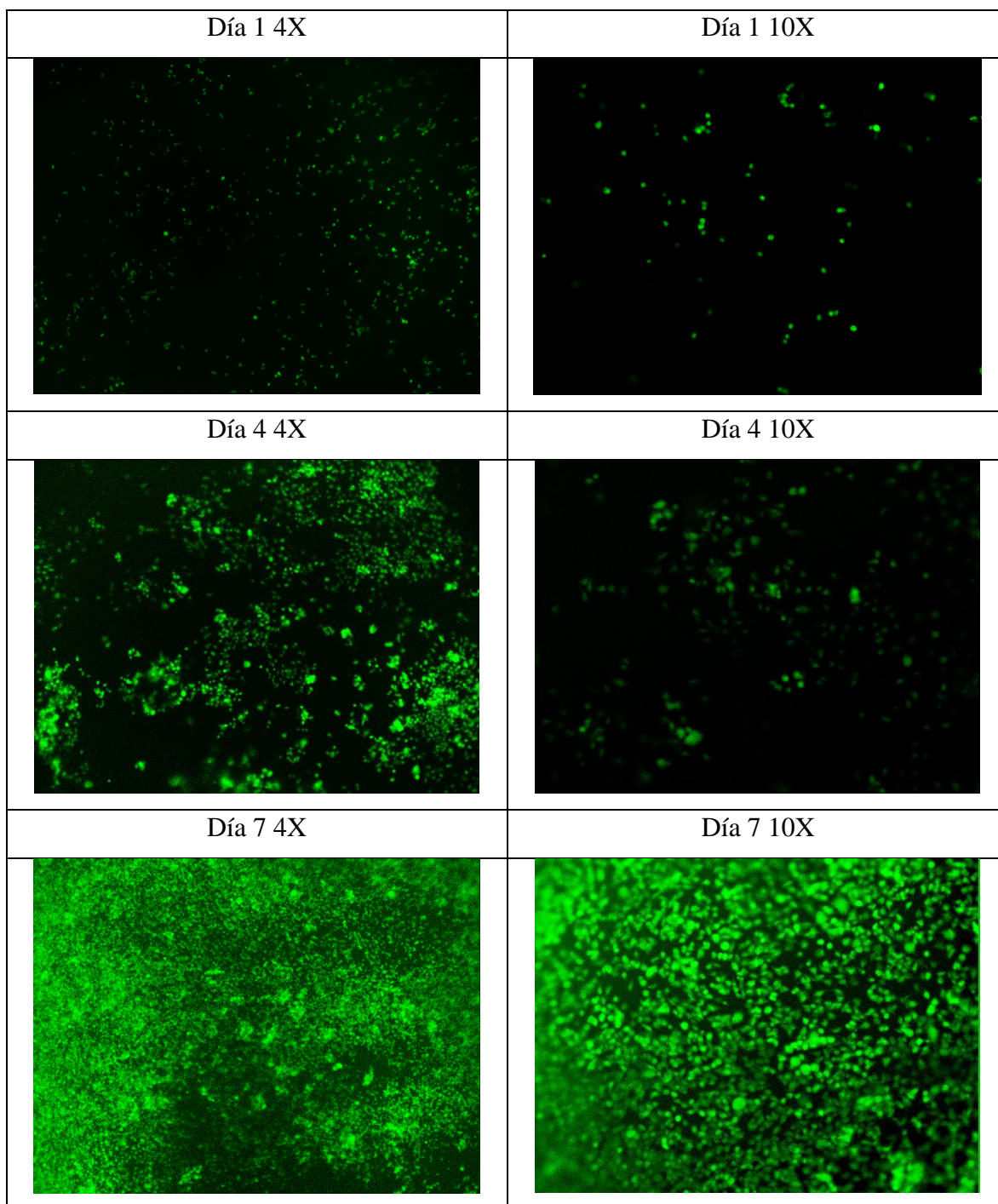
Figura 16. Imágenes de microscopía óptica del crecimiento celular de las células 3T3 24 horas posterior a su exposición en los lixiviados de las estructuras impresas de CNF:PVA. UT: Ctrl positivo (células-medio), Doxo: Ctrl negativo (doxorrubicina), M₁₀₀: lixiviados de membrana de CNF:PVA al 100%, M₈₀: lixiviados de membrana de CNF:PVA al 80%, M₆₀: lixiviados de membrana de CNF:PVA al 60%, M₄₀: lixiviados de membrana de CNF:PVA al 40%, M₂₀: lixiviados de membrana de CNF:PVA al 20%.

Note en la Figura 16, que el control positivo (DMEM) muestra un porcentaje de viabilidad cercano al 100%, lo que indica que no hay ningún agente citotóxico y las células están en óptimas condiciones para su proliferación. Por otro lado, el control negativo (Doxo) presenta una viabilidad celular muy baja, alrededor del 20%, lo que comprueba su efecto citotóxico sobre las células y sirve de referencia para el material en estudio, respecto a su posible citotoxicidad.

Por otro lado, al observar los resultados obtenidos para los lixiviados de las estructuras impresas de CNF:PVA, se observa que en todas las concentraciones de lixiviados se presentan porcentajes de viabilidad cercanos al 100%. Esto significa que las membranas no causaron ningún efecto tóxico significativo en las células.

Posteriormente a las pruebas de citotoxicidad, se realizó un ensayo de proliferación celular de fibroblastos embrionarias de ratón NIH/3T3 sobre las estructuras impresas de CNF:PVA 1:1 medidas por microscopía fluorescencia (Cuadro 11).

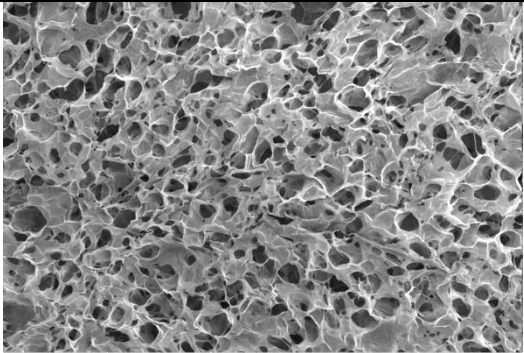
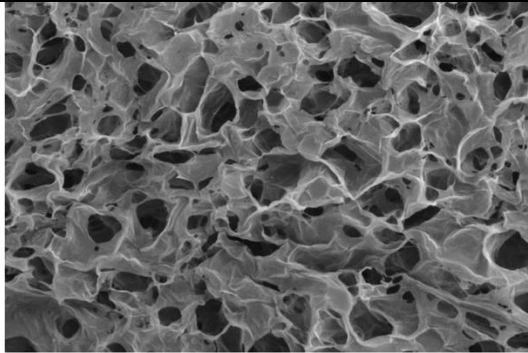
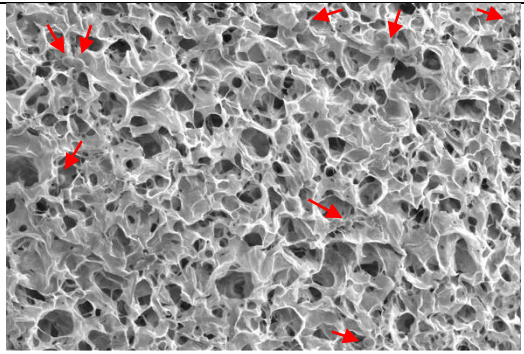
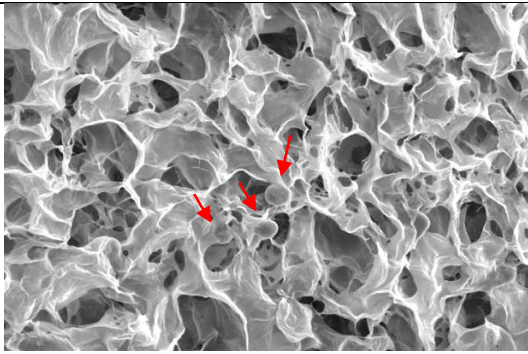
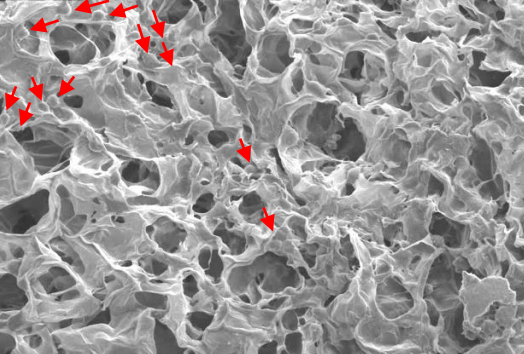
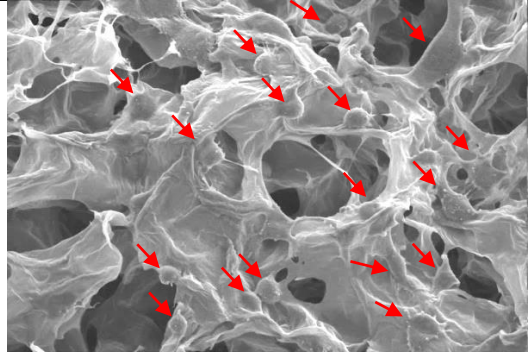
Cuadro 11. Imágenes por fluorescencia del crecimiento de las células NIH/3T3 sobre la estructura impresa de CNF:PVA 1:1 en los días 1, 4 y 7 de cultivo celular



En las imágenes del Cuadro 11, se observa un aumento progresivo en la fluorescencia desde el día 1 hasta el día 7, alcanzando un máximo de fluorescencia en el séptimo día de cultivo celular. El aumento de la fluorescencia en la muestra confirma la actividad proliferativa de las células, las cuales son marcadas con Alamar Blue para poder ser observadas por fluorescencia. Esto demuestra la biocompatibilidad de la membrana cuando entra en contacto directo con células fibroblastos.

Para observar la adhesión celular de las células fibroblastos embrionarias de ratón NIH/3T3 sobre las estructuras impresas de CNF:PVA 1:1, se realizó una fijación de las células y se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Ver Cuadro 12).

Cuadro 12. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la adhesión celular de las células NIH/3T3 en la estructura impresa de CNF:PVA 1:1

Día 1 Sínt Celulas 500X	Día 1 Sínt Celulas 1000X
	
Día 1 Con Celulas 500X	Día 1 Con Celulas 1000X
	
Día 7 Con Células 500X	Día 7 Con Celulas 1000X
	

En el Cuadro 12, se observan imágenes a magnificación de 500X y 1000X de las estructuras impresas CNF:PVA 1:1 sin células, con 1 día de cultivo celular y con 7 días de cultivo celular. Similarmente a los resultados de fluorescencia obtenidos, se puede observar

un crecimiento de células a través de los 7 días, donde se observa un mayor número de células crecidas en el séptimo día de cultivo.

Este comportamiento proliferativo y de adhesión celular puede ser debido a que la morfología porosa de las estructuras impresas de nanocelulosa pueden mejorar la penetración celular y asistir en la penetración celular de las mismas. Estos resultados son similares a membranas impresas de nanofibras de celulosa y nanocelulosa acetilada, donde se observó proliferación y adhesión celular de cardiomioblastos de manera extensiva a través de 21 días para todas las muestras.³⁸

Estos resultados son importantes para determinar su potencial como biomaterial, ya que como los componentes biomédicos tienen un contacto directo con tejido y células del cuerpo, es esencial tener alta biocompatibilidad. Se ha demostrado biocompatibilidad en películas de nanocelulosa y PVA con células mesenquimales de hueso 3T3.¹²³ Otros materiales realizados con electrohilado de nanocelulosa y PVA también presentaron biocompatibilidad con células Schwann RSC96.¹¹⁷ El presente estudio es el primero que evalúa la nanocelulosa extraída de piña como material biocompatible y por ende con posibles aplicaciones biomédicas.

CAPÍTULO VI: Conclusiones

Durante el presente trabajo, fue posible la obtención de celulosa nanofibrilar a partir de residuos de la industria piñera, esto se logró mediante la combinación de un pretratamiento de oxidación mediada por TEMPO, seguido de un tratamiento mecánico de homogenización de alta presión, aplicado a celulosa extraída mediante un pulpeo a la sosa y blanqueada con hipoclorito de sodio.

Se efectuó la caracterización de la celulosa nanofibrilar, donde se evidenció la oxidación exitosa y estabilidad térmica de las nanofibras. Fue posible estudiar la morfología y tamaño de las nanofibras, donde hubo formación de aglomeraciones y pliegues en las mismas, un tamaño de 191 a 479 nm y una carga de $(-84,03 \pm 0,66)$ mV.

Se obtuvieron dos formulaciones adecuadas de biotintas para impresión 3D de CNF:PVA, con las cuales se lograron imprimir estructuras tridimensionales. Se observaron las propiedades viscosas y viscoelásticas de los hidrogeles de CNF:PVA mediante un estudio reológico, las cuales permiten la extrusión de las mismas en la bioimpresora 3D.

Las pruebas de impresión 3D con el sistema de bioimpresión Cellink BioX, demostraron la viabilidad de impresión con las biotintas preparadas, en un rango de presiones neumáticas y velocidades de desplazamiento específicas, para una estructura modelo. Además, fue posible generar estructuras de mayor altura y complejidad como el logo de la UNA y una oreja humana, lo cual demuestra su potencial para generar materiales biomédicos como apósitos, tejido blando y estructuras 3D para cultivo celular.

Las estructuras modelo impresas con la biotinta de PVA:CNF fueron caracterizadas, lo que evidenció una estructura uniforme, porosa, con alta capacidad de hinchamiento, sugiriendo un potencial de aplicación del material en regeneración de tejidos o apósitos de heridas.

Finalmente, fue evaluada la viabilidad celular de las estructuras impresas CNF:PVA, los resultados mostraron que el material no muestra citotoxicidad y presenta actividad proliferativa y adhesiva, utilizando una línea celular de fibroblastos NIH/3T3. Esto sugiere que estas membranas son biocompatibles y no comprometen la viabilidad celular bajo las condiciones experimentales utilizadas.

CAPÍTULO VII: Recomendaciones

Debido al potencial como biomaterial demostrado de las nanofibras obtenidas de rastrojo de piña, se recomienda el uso de otras materias primas agrícolas como lo son el residuo de bagazo de caña, banano o café.

También se recomienda estudiar otras fuentes de celulosa como la celulosa bacteriana para el desarrollo de hidrogeles para bioimpresión 3D.

Se recomienda ampliar el estudio clínico de las estructuras impresas de CNF:PVA y realizar pruebas *in vivo* con algún mamífero de especie menor como lo son ratones o ratas, ya que se demuestra una alta biocompatibilidad de las estructuras impresas y un potencial para desarrollar materiales de curación de heridas u otras aplicaciones para piel.

Para futuras aplicaciones, se recomienda estudiar el material impreso de CNF:PVA como una base para un apósito de piel, ya sea al agregar algún agente antiinflamatorio o fármaco para potenciar su capacidad de sanación de heridas.

Debido a la amplia cantidad de aplicaciones que podría presentar el material, se recomienda el estudio de otras líneas celulares para pruebas *in vitro* como cardiomiocitos, osteoblastos, entre otros.

También se recomienda el estudio de otros materiales en conjunto con la CNF generada, tales como gelatina metacrilada y colágeno metacrilado, ya que estas pueden ser extraídas de material de residuos, permiten el entrecruzamiento por UV durante la impresión 3D y son materiales comúnmente utilizados en aplicaciones biomédicas.

CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS

- (1) Lima, A. R.; Cristofoli, N. L.; Rosa da Costa, A. M.; Saraiva, J. A.; Vieira, M. C. Comparative Study of the Production of Cellulose Nanofibers from Agro-Industrial Waste Streams of *Salicornia Ramosissima* by Acid and Enzymatic Treatment. *Food and Bioproducts Processing* **2023**, *137*, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.11.012>.
- (2) Wen, J.; Zhang, W.; Xu, Y.; Yu, Y.; Lin, X.; Fu, M.; Liu, H.; Peng, J.; Zhao, Z. Cellulose Nanofiber from Pomelo Spongy Tissue as a Novel Particle Stabilizer for Pickering Emulsion. *International Journal of Biological Macromolecules* **2023**, *224*, 1439–1449. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.230>.
- (3) Liu, X.; Sun, H.; Mu, T.; Fauconnier, M. L.; Li, M. Preparation of Cellulose Nanofibers from Potato Residues by Ultrasonication Combined with High-Pressure Homogenization. *Food Chemistry* **2023**, *413*, 135675. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135675>.
- (4) Vasistha, S.; Balakrishnan, D.; Manivannan, A.; Rai, M. P. Microalgae on Distillery Wastewater Treatment for Improved Biodiesel Production and Cellulose Nanofiber Synthesis: A Sustainable Biorefinery Approach. *Chemosphere* **2023**, *315*, 137666. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137666>.
- (5) Fauzee, S. N.; Othaman, R. Extraction and Dissolution of Cellulose from *Nypa* Fruit Husk for Nanofibers Fabrication; Selangor, Malaysia, 2013; pp 904–910. <https://doi.org/10.1063/1.4858769>.
- (6) De Haro-Niza, J.; Rincón, E.; Gonzalez, Z.; Espinosa, E.; Rodríguez, A. Nanocellulose from Spanish Harvesting Residues to Improve the Sustainability and Functionality of Linerboard Recycling Processes. *Nanomaterials* **2022**, *12* (24), 4447. <https://doi.org/10.3390/nano12244447>.
- (7) Balea, A.; Merayo, N.; Fuente, E.; Delgado-Aguilar, M.; Mutje, P.; Blanco, A.; Negro, C. Valorization of Corn Stalk by the Production of Cellulose Nanofibers to Improve Recycled Paper Properties. *BioResources* **2016**, *11* (2), 3416–3431. <https://doi.org/10.15376/biores.11.2.3416-3431>.
- (8) Xing, H.; Fei, Y.; Cheng, J.; Wang, C.; Zhang, J.; Niu, C.; Fu, Q.; Cheng, J.; Lu, L. Green Preparation of Durian Rind-Based Cellulose Nanofiber and Its Application in Aerogel. *Molecules* **2022**, *27* (19), 6507. <https://doi.org/10.3390/molecules27196507>.
- (9) Araya-Chavarría, K.; Rojas, R.; Ramírez-Amador, K.; Sulbarán-Rangel, B.; Rojas, O.; Esquivel-Alfaro, M. Cellulose Nanofibers as Functional Biomaterial from Pineapple Stubbles via TEMPO Oxidation and Mechanical Process. *Waste Biomass Valor* **2022**, *13* (3), 1749–1758. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01619-3>.
- (10) Cernencu, A. I.; Lungu, A.; Dragusin, D. M.; Stancu, I. C.; Dinescu, S.; Balahura, L. R.; Mereuta, P.; Costache, M.; Iovu, H. 3D Bioprinting of Biosynthetic Nanocellulose-Filled GelMA Inks Highly Reliable for Soft Tissue-Oriented Constructs. *Materials* **2021**, *14* (17), 4891. <https://doi.org/10.3390/ma14174891>.
- (11) Lameirinhas, N. S.; Teixeira, M. C.; Carvalho, J. P. F.; Valente, B. F. A.; Pinto, R. J. B.; Oliveira, H.; Luís, J. L.; Pires, L.; Oliveira, J. M.; Vilela, C.; Freire, C. S. R. Nanofibrillated Cellulose/Gellan Gum Hydrogel-Based Bioinks for 3D Bioprinting of Skin Cells. *International Journal of Biological Macromolecules* **2023**, *229*, 849–860. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.227>.
- (12) Markstedt, K.; Mantas, A.; Tournier, I.; Martínez Ávila, H.; Hägg, D.; Gatenholm, P. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose–Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (5), 1489–1496.

- <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00188>.
- (13) Baniasadi, H.; Madani, Z.; Ajdary, R.; Rojas, O. J.; Seppälä, J. Ascorbic Acid-Loaded Polyvinyl Alcohol/Cellulose Nanofibril Hydrogels as Precursors for 3D Printed Materials. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *130*, 112424. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112424>.
- (14) *The Pineapple: Botany, Production and Uses*, 1st ed.; Bartholomew, D. P., Paull, R. E., Rohrbach, K. G., Eds.; CABI Publishing: UK, 2003. <https://doi.org/10.1079/9780851995038.0000>.
- (15) Aguirre, D.; Arboleda, E. Impacto Ambiental Del Cultivo de Piña y Características de Éste (Caso Siquirres). *Ambientico* **2008**, *177* (149–214), 3–8. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- (16) Montero, M.; Cerdas, M. *Guías Técnicas Del Manejo Poscosecha Para El Mercado Fresco Piña (Ananas Comosus)*, 1st ed.; MAG: Costa Rica, 2005.
- (17) Alvarado, P.; Quesada, K.; Sibaja, R.; Vega, J. Utilización de Las Fibras Del Rastrojo de Piña (Ananas Comosus, Variedad Champaka) Como Material de Refuerzo En Resinas de Poliéster. *Rev. Iberoam. Polímeros* **2005**, *6* (2), 157–179.
- (18) Rojas, T.; Porras, S.; Jimenez, L.; Bolaños, A.; Van der Lucht, A. *Plan de Acción Conjunto SFE/SENASA Para El Combate de La Mosca Del Establo (Stomoxys Calcitrans) (L.)*; Comisión Técnica Fitosanitaria/Dirección General SENASA: Costa Rica, 2006.
- (19) Garcia, R. A.; Stevanovic, T.; Berthier, J.; Njamen, G.; Tolnai, B.; Achim, A. Cellulose, Nanocellulose, and Antimicrobial Materials for the Manufacture of Disposable Face Masks: A Review. *BioRes* **2021**, *16* (2), 4321–4353. <https://doi.org/10.15376/biores.16.2.Garcia>.
- (20) Xu, X.; Liu, F.; Jiang, L.; Zhu, J. Y.; Haagensohn, D.; Wiesenborn, D. P. Cellulose Nanocrystals vs. Cellulose Nanofibrils: A Comparative Study on Their Microstructures and Effects as Polymer Reinforcing Agents. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5* (8), 2999–3009. <https://doi.org/10.1021/am302624t>.
- (21) Dufresne, A. Cellulose and Potential Reinforcement. *Nanocellulose: from nature to high performance tailored materials*; DE GRUYTER: Berlin/Boston, 2012; pp 1–34.
- (22) Gumrah Dumanli, A. Nanocellulose and Its Composites for Biomedical Applications. *CMC* **2017**, *24* (5), 512–528. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161014124008>.
- (23) Gibson, L. J. The Hierarchical Structure and Mechanics of Plant Materials. *J. R. Soc. Interface*. **2012**, *9* (76), 2749–2766. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0341>.
- (24) Jonoobi, M.; Harun, J.; Mathew, A. P.; Hussein, M. Z. B.; Oksman, K. Preparation of Cellulose Nanofibers with Hydrophobic Surface Characteristics. *Cellulose* **2010**, *17* (2), 299–307. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9387-9>.
- (25) Siqueira, G.; Oksman, K.; Tadokoro, S. K.; Mathew, A. P. Re-Dispersible Carrot Nanofibers with High Mechanical Properties and Reinforcing Capacity for Use in Composite Materials. *Composites Science and Technology* **2016**, *123*, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2015.12.001>.
- (26) Arola, S.; Malho, J.; Laaksonen, P.; Lille, M.; Linder, M. B. The Role of Hemicellulose in Nanofibrillated Cellulose Networks. *Soft Matter* **2013**, *9* (4), 1319–1326. <https://doi.org/10.1039/C2SM26932E>.
- (27) Iwamoto, S.; Abe, K.; Yano, H. The Effect of Hemicelluloses on Wood Pulp Nanofibrillation and Nanofiber Network Characteristics. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (3), 1022–1026. <https://doi.org/10.1021/bm701157n>.

- (28) Hiasa, S.; Iwamoto, S.; Endo, T.; Edashige, Y. Isolation of Cellulose Nanofibrils from Mandarin (Citrus Unshiu) Peel Waste. *Industrial Crops and Products* **2014**, *62*, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.007>.
- (29) Hassan, M. L.; Mathew, A. P.; Hassan, E. A.; El-Wakil, N. A.; Oksman, K. Nanofibers from Bagasse and Rice Straw: Process Optimization and Properties. *Wood Sci Technol* **2012**, *46* (1–3), 193–205. <https://doi.org/10.1007/s00226-010-0373-z>.
- (30) Nguyen Chi Thi Xuan; Bui Khue Hai; Truong Binh Yen; Do Nga Hoang Nguyen; Le Phung Thi Kim. Nanocellulose from Pineapple Leaf and Its Applications towards High-Value Engineering Materials. *Chemical Engineering Transactions* **2021**, *89*, 19–24. <https://doi.org/10.3303/CET2189004>.
- (31) Hidenó, A.; Abe, K.; Yano, H. Preparation Using Pectinase and Characterization of Nanofibers from Orange Peel Waste in Juice Factories: Nanofibers from Orange Peel Waste.... *Journal of Food Science* **2014**, *79* (6), N1218–N1224. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12471>.
- (32) Liu, Y.; Liu, H.; Shen, Z. Nanocellulose Based Filtration Membrane in Industrial Waste Water Treatment: A Review. *Materials* **2021**, *14* (18), 5398. <https://doi.org/10.3390/ma14185398>.
- (33) Berglund, L.; Noël, M.; Aitomäki, Y.; Öman, T.; Oksman, K. Production Potential of Cellulose Nanofibers from Industrial Residues: Efficiency and Nanofiber Characteristics. *Industrial Crops and Products* **2016**, *92*, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.003>.
- (34) Araya-Chavarría, K. Nanofibrilación de Celulosa Extraída a Partir Del Rastrojo de La Piña (Ananas Comosus), Universidad Nacional, Costa Rica, 2021.
- (35) Ajdary, R. Structuring of Nanocelluloses in 3-D Functional Materials. Doctoral Dissertation, Aalto University, Finland, 2022.
- (36) Simpson, T. Additive Manufacturing Is Growing Up. *Modern Machine Shop*. 2022, p 32. <https://www.proquest.com/trade-journals/additive-manufacturing-is-growing-up/docview/2638095724/se-2>.
- (37) ISO. *ISO/ASTM 52900:2021: Additive Manufacturing — General Principles — Fundamentals and Vocabulary*; 2022. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-astm:52900:ed-2:v1:en>.
- (38) Ajdary, R.; Huan, S.; Zanjanizadeh Ezazi, N.; Xiang, W.; Grande, R.; Santos, H. A.; Rojas, O. J. Acetylated Nanocellulose for Single-Component Bioinks and Cell Proliferation on 3D-Printed Scaffolds. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (7), 2770–2778. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00527>.
- (39) Ajdary, R.; Ezazi, N. Z.; Correia, A.; Kemell, M.; Huan, S.; Ruskoaho, H. J.; Hirvonen, J.; Santos, H. A.; Rojas, O. J. Multifunctional 3D-Printed Patches for Long-Term Drug Release Therapies after Myocardial Infarction. *Adv Funct Materials* **2020**, *30* (34), 2003440. <https://doi.org/10.1002/adfm.202003440>.
- (40) Chinga-Carrasco, G. Biocomposite Inks for 3D Printing. *Bioengineering* **2021**, *8* (8), 102. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8080102>.
- (41) Kolesky, D. B.; Truby, R. L.; Gladman, A. S.; Busbee, T. A.; Homan, K. A.; Lewis, J. A. 3D Bioprinting of Vascularized, Heterogeneous Cell-Laden Tissue Constructs. *Adv. Mater.* **2014**, *26* (19), 3124–3130. <https://doi.org/10.1002/adma.201305506>.
- (42) Rosendahl, J.; Svanström, A.; Berglin, M.; Petronis, S.; Bogestål, Y.; Stenlund, P.; Standoft, S.; Ståhlberg, A.; Landberg, G.; Chinga-Carrasco, G.; Håkansson, J. 3D Printed Nanocellulose Scaffolds as a Cancer Cell Culture Model System. *Bioengineering* **2021**, *8*

- (7), 97. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8070097>.
- (43) Aeby, X.; Poulin, A.; Siqueira, G.; Hausmann, M. K.; Nyström, G. Fully 3D Printed and Disposable Paper Supercapacitors. *Adv. Mater.* **2021**, *33* (26), 2101328. <https://doi.org/10.1002/adma.202101328>.
- (44) Yazdani, M. R.; Ajdary, R.; Kankkunen, A.; Rojas, O. J.; Seppälä, A. Cellulose Nanofibrils Endow Phase-Change Polyethylene Glycol with Form Control and Solid-to-Gel Transition for Thermal Energy Storage. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (5), 6188–6200. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c18623>.
- (45) Zhao, S.; Siqueira, G.; Drdova, S.; Norris, D.; Ubert, C.; Bonnin, A.; Galmarini, S.; Ganobjak, M.; Pan, Z.; Brunner, S.; Nyström, G.; Wang, J.; Koebel, M. M.; Malfait, W. J. Additive Manufacturing of Silica Aerogels. *Nature* **2020**, *584* (7821), 387–392. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2594-0>.
- (46) Müller, L. A. E.; Zimmermann, T.; Nyström, G.; Burgert, I.; Siqueira, G. Mechanical Properties Tailoring of 3D Printed Photoresponsive Nanocellulose Composites. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30* (35), 2002914. <https://doi.org/10.1002/adfm.202002914>.
- (47) Muth, J. T.; Vogt, D. M.; Truby, R. L.; Mengüç, Y.; Kolesky, D. B.; Wood, R. J.; Lewis, J. A. Embedded 3D Printing of Strain Sensors within Highly Stretchable Elastomers. *Adv. Mater.* **2014**, *26* (36), 6307–6312. <https://doi.org/10.1002/adma.201400334>.
- (48) Zhou, N.; Liu, C.; Lewis, J. A.; Ham, D. Gigahertz Electromagnetic Structures via Direct Ink Writing for Radio-Frequency Oscillator and Transmitter Applications. *Adv. Mater.* **2017**, *29* (15), 1605198. <https://doi.org/10.1002/adma.201605198>.
- (49) Kim, Y.; Yuk, H.; Zhao, R.; Chester, S. A.; Zhao, X. Printing Ferromagnetic Domains for Untethered Fast-Transforming Soft Materials. *Nature* **2018**, *558* (7709), 274–279. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0185-0>.
- (50) Skylar-Scott, M. A.; Mueller, J.; Visser, C. W.; Lewis, J. A. Voxeled Soft Matter via Multimaterial Multinozzle 3D Printing. *Nature* **2019**, *575* (7782), 330–335. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1736-8>.
- (51) Truby, R. L.; Wehner, M.; Grosskopf, A. K.; Vogt, D. M.; Uzel, S. G. M.; Wood, R. J.; Lewis, J. A. Soft Somatosensitive Actuators via Embedded 3D Printing. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (15), 1706383. <https://doi.org/10.1002/adma.201706383>.
- (52) Jiang, B.; Yao, Y.; Liang, Z.; Gao, J.; Chen, G.; Xia, Q.; Mi, R.; Jiao, M.; Wang, X.; Hu, L. Lignin-Based Direct Ink Printed Structural Scaffolds. *Small* **2020**, *16* (31), 1907212. <https://doi.org/10.1002/sml.201907212>.
- (53) Froelich, A. World's First 3d-Printed Bridge Opens to Cyclists. <https://inhabitat.com/worlds-first-3d-printed-bridge-opens-in-the-netherlands/>.
- (54) Padstyle. World's First 3D Printed Concrete Living Community in the Netherlands. <https://padstyle.com/worlds-first-3d-printed-concrete-living-community-in-the-netherlands/6626>.
- (55) Park, S.; Sharmin, T.; Cho, S.-M.; Kelley, S. S.; Shirwaiker, R. A.; Park, S. Single-Component Cellulose Acetate Sulfate Hydrogels for Direct Ink Writing 3D Printing. *Biomacromolecules* **2024**, *25* (9), 5889–5901. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.4c00578>.
- (56) Mills, D. K.; Tappa, K.; Jammalamadaka, U.; Mills, P. A. S.; Alexander, J. S.; Weisman, J. A. Medical Applications for 3D Printing. In *Advances in Manufacturing and Processing of Materials and Structures*; Bar-Cohen, Y., Ed.; CRC Press, 2018; pp 163–186. <https://doi.org/10.1201/b22020-8>.
- (57) Aimar, A.; Palermo, A.; Innocenti, B. The Role of 3D Printing in Medical

Applications: A State of the Art. *Journal of Healthcare Engineering* **2019**, 2019, 1–10.
<https://doi.org/10.1155/2019/5340616>.

(58) Cui, H.; Yu, Y.; Li, X.; Sun, Z.; Ruan, J.; Wu, Z.; Qian, J.; Yin, J. Direct 3D Printing of a Tough Hydrogel Incorporated with Carbon Nanotubes for Bone Regeneration. *J. Mater. Chem. B* **2019**, 7 (45), 7207–7217. <https://doi.org/10.1039/C9TB01494B>.

(59) Yang, C.; Wang, X.; Ma, B.; Zhu, H.; Huan, Z.; Ma, N.; Wu, C.; Chang, J. 3D-Printed Bioactive Ca₃SiO₅ Bone Cement Scaffolds with Nano Surface Structure for Bone Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9 (7), 5757–5767.
<https://doi.org/10.1021/acsami.6b14297>.

(60) Patel, D. K.; Dutta, S. D.; Shin, W.-C.; Ganguly, K.; Lim, K.-T. Fabrication and Characterization of 3D Printable Nanocellulose-Based Hydrogels for Tissue Engineering. *RSC Adv.* **2021**, 11 (13), 7466–7478. <https://doi.org/10.1039/D0RA09620B>.

(61) Xu, C.; Zhang Molino, B.; Wang, X.; Cheng, F.; Xu, W.; Molino, P.; Bacher, M.; Su, D.; Rosenau, T.; Willför, S.; Wallace, G. 3D Printing of Nanocellulose Hydrogel Scaffolds with Tunable Mechanical Strength towards Wound Healing Application. *J. Mater. Chem. B* **2018**, 6 (43), 7066–7075. <https://doi.org/10.1039/C8TB01757C>.

(62) Mohan, D.; Khairullah, N. F.; How, Y. P.; Sajab, M. S.; Kaco, H. 3D Printed Laminated CaCO₃-Nanocellulose Films as Controlled-Release 5-Fluorouracil. *Polymers* **2020**, 12 (4), 986. <https://doi.org/10.3390/polym12040986>.

(63) Olmos-Juste, R.; Alonso-Lerma, B.; Pérez-Jiménez, R.; Gabilondo, N.; Eceiza, A. 3D Printed Alginate-Cellulose Nanofibers Based Patches for Local Curcumin Administration. *Carbohydrate Polymers* **2021**, 264, 118026.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118026>.

(64) Vrana, N. E.; Gupta, S.; Mitra, K.; Rizvanov, A. A.; Solovyeva, V. V.; Antmen, E.; Salehi, M.; Ehterami, A.; Pourchet, L.; Barthes, J.; Marquette, C. A.; Von Unge, M.; Wang, C.-Y.; Lai, P.-L.; Bit, A. From 3D Printing to 3D Bioprinting: The Material Properties of Polymeric Material and Its Derived Bioink for Achieving Tissue Specific Architectures. *Cell Tissue Bank* **2022**, 23 (3), 417–440. <https://doi.org/10.1007/s10561-021-09975-z>.

(65) Pedroza-González, S. C.; Rodriguez-Salvador, M.; Pérez Benítez, B. E.; Alvarez, M. M.; Trujillo-de Santiago, G. Bioinks for 3D Bioprinting: A Scientometric Analysis of Two Decades of Progress. *Int J Bioprint* **2021**, 7 (2). <https://doi.org/10.18063/ijb.v7i2.337>.

(66) Raees, S.; Ullah, F.; Javed, F.; Akil, H. Md.; Jadoon Khan, M.; Safdar, M.; Din, I. U.; Alotaibi, M. A.; Alharthi, A. I.; Bakht, M. A.; Ahmad, A.; Nassar, A. A. Classification, Processing, and Applications of Bioink and 3D Bioprinting: A Detailed Review. *International Journal of Biological Macromolecules* **2023**, 232, 123476.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123476>.

(67) Aarseth, I. Bioprinting of Functionalized Alginate-Nanocellulose Scaffolds for 3D Cultivation of Human Dermal Fibroblasts. Master's Thesis, NTNU, Norway, 2022.

(68) Bensefelt, T. Design of Cellulose-Based Materials by Supramolecular Assemblies. Doctoral Thesis, KTH Royal Inst. Tech., Sweden, 2019.

(69) Im, S.; Choe, G.; Seok, J. M.; Yeo, S. J.; Lee, J. H.; Kim, W. D.; Lee, J. Y.; Park, S. A. An Osteogenic Bioink Composed of Alginate, Cellulose Nanofibrils, and Polydopamine Nanoparticles for 3D Bioprinting and Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* **2022**, 205, 520–529.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.012>.

(70) Lafuente-Merchan, M.; Ruiz-Alonso, S.; Espona-Noguera, A.; Galvez-Martin, P.; López-Ruiz, E.; Marchal, J. A.; López-Donaire, M. L.; Zabala, A.; Ciriza, J.; Saenz-del-

- Burgo, L.; Pedraz, J. L. Development, Characterization and Sterilisation of Nanocellulose-Alginate-(Hyaluronic Acid)- Bioinks and 3D Bioprinted Scaffolds for Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *126*, 112160. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112160>.
- (71) Leppiniemi, J.; Lahtinen, P.; Paajanen, A.; Mahlberg, R.; Metsä-Kortelainen, S.; Pinomaa, T.; Pajari, H.; Vikholm-Lundin, I.; Pursula, P.; Hytönen, V. P. 3D-Printable Bioactivated Nanocellulose–Alginate Hydrogels. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (26), 21959–21970. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b02756>.
- (72) Amini, M.; Kamkar, M.; Ahmadijokani, F.; Ghaderi, S.; Rojas, O. J.; Hosseini, H.; Arjmand, M. Mapping 3D Printability of Ionically Cross-Linked Cellulose Nanocrystal Inks: Architecting from Nano- to Macroscale Structures. *Biomacromolecules* **2023**, *24* (2), 775–788. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01241>.
- (73) Lin, L.; Jiang, S.; Yang, J.; Qiu, J.; Jiao, X.; Yue, X.; Ke, X.; Yang, G.; Zhang, L. Application of 3D-Bioprinted Nanocellulose and Cellulose Derivative-Based Bio-Inks in Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Int J Bioprint* **2022**, *9* (1). <https://doi.org/10.18063/ijb.v9i1.637>.
- (74) Aarstad, O.; Heggset, E.; Pedersen, I.; Bjørnøy, S.; Syverud, K.; Strand, B. Mechanical Properties of Composite Hydrogels of Alginate and Cellulose Nanofibrils. *Polymers* **2017**, *9* (12), 378. <https://doi.org/10.3390/polym9080378>.
- (75) Wang, X.; Wang, Q.; Xu, C. Nanocellulose-Based Inks for 3D Bioprinting: Key Aspects in Research Development and Challenging Perspectives in Applications—A Mini Review. *Bioengineering* **2020**, *7* (2), 40. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7020040>.
- (76) Müller, M.; Öztürk, E.; Arlov, Ø.; Gatenholm, P.; Zenobi-Wong, M. Alginate Sulfate–Nanocellulose Bioinks for Cartilage Bioprinting Applications. *Ann Biomed Eng* **2017**, *45* (1), 210–223. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1704-5>.
- (77) Lin, N.; Huang, J.; Dufresne, A. Preparation, Properties and Applications of Polysaccharide Nanocrystals in Advanced Functional Nanomaterials: A Review. *Nanoscale* **2012**, *4* (11), 3274. <https://doi.org/10.1039/c2nr30260h>.
- (78) Hakalahti, M.; Salminen, A.; Seppälä, J.; Tammelin, T.; Hänninen, T. Effect of Interfibrillar PVA Bridging on Water Stability and Mechanical Properties of TEMPO/NaClO₂ Oxidized Cellulosic Nanofibril Films. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *126*, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.007>.
- (79) Leppänen, I.; Lappalainen, T.; Lohtander, T.; Jonkergouw, C.; Arola, S.; Tammelin, T. *Capturing the Colloidal Microplastics with Plant-Based Nanocellulose Networks*; preprint; In Review, 2021. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-286541/v1>.
- (80) Chen, X.; Chen, C.; Zhang, H.; Huang, Y.; Yang, J.; Sun, D. Facile Approach to the Fabrication of 3D Cellulose Nanofibrils (CNFs) Reinforced Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel with Ideal Biocompatibility. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *173*, 547–555. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.036>.
- (81) Baniasadi, M.; Baniasadi, H.; Azimi, R.; Khosravi Dehaghi, N. Fabrication and Characterization of a Wound Dressing Composed of Polyvinyl Alcohol/Nanochitosan/*Artemisia Ciniformis* Extract: An RSM Study. *Polymer Engineering & Sci* **2020**, *60* (7), 1459–1473. <https://doi.org/10.1002/pen.25393>.
- (82) Herrada-Manchón, H.; Fernández, M. A.; Aguilar, E. Essential Guide to Hydrogel Rheology in Extrusion 3D Printing: How to Measure It and Why It Matters? *Gels* **2023**, *9* (7), 517. <https://doi.org/10.3390/gels9070517>.
- (83) Kuo, C.-C.; Qin, H.; Cheng, Y.; Jiang, X.; Shi, X. An Integrated Manufacturing

- Strategy to Fabricate Delivery System Using Gelatin/Alginate Hybrid Hydrogels: 3D Printing and Freeze-Drying. *Food Hydrocolloids* **2021**, *111*, 106262. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106262>.
- (84) Mao, A. S.; Mooney, D. J. Regenerative Medicine: Current Therapies and Future Directions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112* (47), 14452–14459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508520112>.
- (85) FDA. *Use of International Standard ISO 10993–1: “Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity*”; Center for Devices and Radiological Health, 2016. <https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm348890>.
- (86) FDA. *Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity*; International Organization for Standardization: Geneva, 2009. <https://www.fda.gov/medical-devices/personal-protective-equipment-infection-control/medical-gowns>.
- (87) Wang, Z.; Kapadia, W.; Li, C.; Lin, F.; Pereira, R. F.; Granja, P. L.; Sarmiento, B.; Cui, W. Tissue-Specific Engineering: 3D Bioprinting in Regenerative Medicine. *Journal of Controlled Release* **2021**, *329*, 237–256. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.11.044>.
- (88) Lei, H.; Zhu, C.; Fan, D. Optimization of Human-like Collagen Composite Polysaccharide Hydrogel Dressing Preparation Using Response Surface for Burn Repair. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *239*, 116249. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116249>.
- (89) Baniasadi, H.; Ramazani S.A., A.; Mashayekhan, S. Fabrication and Characterization of Conductive Chitosan/Gelatin-Based Scaffolds for Nerve Tissue Engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, *74*, 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.014>.
- (90) ANSI. TAPPI/ANSI T 204 Cm-17: Solvent Extractives of Wood and Pulp, 2021. <https://tappi.org>.
- (91) ANSI. TAPPI/ANSI T 222 Om-21: Acid-Insoluble Lignin in Wood and Pulp, 2021. <https://www.tappi.org>.
- (92) Depto. Madera, Cel y Papel. Método Usual WISE: Determinación de Holocelulosa, 1946.
- (93) Gao, T. M.; Huang, M. F.; Li, P. W.; Han, Z. P.; Xie, R. H.; Chen, H. L. Preparation and Characterization Nano-Cellulose and Its Surface Modification by Silane Coupling Agent. *AMM* **2012**, *217–219*, 260–263. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.217-219.260>.
- (94) Jiang, F.; Han, S.; Hsieh, Y.-L. Controlled Defibrillation of Rice Straw Cellulose and Self-Assembly of Cellulose Nanofibrils into Highly Crystalline Fibrous Materials. *RSC Adv.* **2013**, *3* (30), 12366. <https://doi.org/10.1039/c3ra41646a>.
- (95) Saito, T.; Isogai, A. TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. The Effect of Oxidation Conditions on Chemical and Crystal Structures of the Water-Insoluble Fractions. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (5), 1983–1989. <https://doi.org/10.1021/bm0497769>.
- (96) Saito, T.; Nishiyama, Y.; Putaux, J.-L.; Vignon, M.; Isogai, A. Homogeneous Suspensions of Individualized Microfibrils from TEMPO-Catalyzed Oxidation of Native Cellulose. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (6), 1687–1691. <https://doi.org/10.1021/bm060154s>.
- (97) Khanjanzadeh, H.; Park, B.-D. Characterization of Carboxylated Cellulose Nanocrystals from Recycled Fiberboard Fibers Using Ammonium Persulfate Oxidation. *Journal of the Korean Wood Science and Technology* **2020**, *48* (2), 231–244.

- <https://doi.org/10.5658/WOOD.2020.48.2.231>.
- (98) Gamelas, J. A. F.; Pedrosa, J.; Lourenço, A. F.; Mutjé, P.; González, I.; Chinga-Carrasco, G.; Singh, G.; Ferreira, P. J. T. On the Morphology of Cellulose Nanofibrils Obtained by TEMPO-Mediated Oxidation and Mechanical Treatment. *Micron* **2015**, *72*, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2015.02.003>.
- (99) Usov, I.; Nyström, G.; Adamcik, J.; Handschin, S.; Schütz, C.; Fall, A.; Bergström, L.; Mezzenga, R. Understanding Nanocellulose Chirality and Structure–Properties Relationship at the Single Fibril Level. *Nat Commun* **2015**, *6* (1), 7564. <https://doi.org/10.1038/ncomms8564>.
- (100) Chen, S.; Schueneman, G.; Pipes, R. B.; Youngblood, J.; Moon, R. J. Effects of Crystal Orientation on Cellulose Nanocrystals–Cellulose Acetate Nanocomposite Fibers Prepared by Dry Spinning. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (10), 3827–3835. <https://doi.org/10.1021/bm501161v>.
- (101) Segal, L.; Creely, J. J.; Martin, A. E.; Conrad, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal* **1959**, *29* (10), 786–794. <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>.
- (102) Alemdar, A.; Sain, M. Isolation and Characterization of Nanofibers from Agricultural Residues – Wheat Straw and Soy Hulls. *Bioresource Technology* **2008**, *99* (6), 1664–1671. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.029>.
- (103) Reddy, N.; Yang, Y. Biofibers from Agricultural Byproducts for Industrial Applications. *Trends in Biotechnology* **2005**, *23* (1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.002>.
- (104) Moreno, G.; Ramirez, K.; Esquivel, M.; Jimenez, G. Isolation and Characterization of Nanocellulose Obtained from Industrial Crop Waste Resources by Using Mild Acid Hydrolysis. *J Renew Mater* **2018**, *6* (4), 362–369. <https://doi.org/10.7569/JRM.2017.634167>.
- (105) UCIPM. *Photosystem II Inhibitors*. Herbicide Damage. https://herbicidesymptoms.ipm.ucanr.edu/MOA/Photosystem_II_Inhibitors/#:~:text=In%20general%2C%20these%20herbicides%20inhibit,energy%20needed%20for%20plant%20growth.
- (106) Coseri, S.; Biliuta, G.; Zemljíč, L. F.; Srndovic, J. S.; Larsson, P. T.; Strnad, S.; Kreže, T.; Naderi, A.; Lindström, T. One-Shot Carboxylation of Microcrystalline Cellulose in the Presence of Nitroxyl Radicals and Sodium Periodate. *RSC Adv.* **2015**, *5* (104), 85889–85897. <https://doi.org/10.1039/C5RA16183E>.
- (107) Malvern Panalytical. Mastersizer Range. <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/mastersizer-range>.
- (108) Albornoza-Palma, G.; Betancourt, F.; Mendonça, R. T.; Chinga-Carrasco, G.; Pereira, M. Relationship between Rheological and Morphological Characteristics of Cellulose Nanofibrils in Dilute Dispersions. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *230*, 115588. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115588>.
- (109) Iwamoto, S.; Lee, S.-H.; Endo, T. Relationship between Aspect Ratio and Suspension Viscosity of Wood Cellulose Nanofibers. *Polym J* **2014**, *46* (1), 73–76. <https://doi.org/10.1038/pj.2013.64>.
- (110) Cherian, B. M.; Leão, A. L.; De Souza, S. F.; Thomas, S.; Pothan, L. A.; Kottaisamy, M. Isolation of Nanocellulose from Pineapple Leaf Fibres by Steam Explosion. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *81* (3), 720–725. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.046>.

- (111) Jowkarderis, L.; Van De Ven, T. G. M. Intrinsic Viscosity of Aqueous Suspensions of Cellulose Nanofibrils. *Cellulose* **2014**, *21* (4), 2511–2517. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0292-5>.
- (112) Hou, Y.; He, Z.; Zhu, Y.; Wu, H. Intrinsic Kink Deformation in Nanocellulose. *Carbohydrate Polymers* **2021**, *273*, 118578. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118578>.
- (113) Yang, H.; Yan, R.; Chen, H.; Lee, D. H.; Zheng, C. Characteristics of Hemicellulose, Cellulose and Lignin Pyrolysis. *Fuel* **2007**, *86* (12–13), 1781–1788. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.12.013>.
- (114) Lee, C. H.; Khalina, A.; Lee, S. H.; Padzil, F. N. M.; Ainun, Z. M. A. Physical, Morphological, Structural, Thermal and Mechanical Properties of Pineapple Leaf Fibers. In *Pineapple Leaf Fibers*; Jawaid, M., Asim, M., Tahir, P. Md., Nasir, M., Eds.; Green Energy and Technology; Springer Singapore: Singapore, 2020; pp 91–121. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1416-6_6.
- (115) Fukuzumi, H.; Saito, T.; Okita, Y.; Isogai, A. Thermal Stabilization of TEMPO-Oxidized Cellulose. *Polymer Degradation and Stability* **2010**, *95* (9), 1502–1508. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.06.015>.
- (116) Maynor Vargas-Vargas; Rodolfo Hernández-Chaverri; Arlette Jiménez-Silva. Caracterización de La Biomasa de Piña (Ananas Comosus) y Su Valorización En La Propagación Micelial Del Hongo Shiitake (Lentinula Edodes). *Yulok Revista de Innovación Académica*. 2019, pp 13–27.
- (117) Moud, A. A.; Kamkar, M.; Sanati-Nezhad, A.; Hejazi, S. H.; Sundararaj, U. Viscoelastic Properties of Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogels with Cellulose Nanocrystals Fabricated through Sodium Chloride Addition: Rheological Evidence of Double Network Formation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2021**, *609*, 125577. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125577>.
- (118) Fourmann, O.; Hausmann, M. K.; Neels, A.; Schubert, M.; Nyström, G.; Zimmermann, T.; Siqueira, G. 3D Printing of Shape-Morphing and Antibacterial Anisotropic Nanocellulose Hydrogels. *Carbohydrate Polymers* **2021**, *259*, 117716. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117716>.
- (119) Zhang, J.; Allardyce, B. J.; Rajkhowa, R.; Kalita, S.; Dilley, R. J.; Wang, X.; Liu, X. Silk Particles, Microfibrils and Nanofibrils: A Comparative Study of Their Functions in 3D Printing Hydrogel Scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* **2019**, *103*, 109784. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109784>.
- (120) Sudheesh Kumar, P. T.; Lakshmanan, V.-K.; Anilkumar, T. V.; Ramya, C.; Reshmi, P.; Unnikrishnan, A. G.; Nair, S. V.; Jayakumar, R. Flexible and Microporous Chitosan Hydrogel/Nano ZnO Composite Bandages for Wound Dressing: In Vitro and In Vivo Evaluation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4* (5), 2618–2629. <https://doi.org/10.1021/am300292v>.
- (121) Yavari Maroufi, L.; Ghorbani, M. Injectable Chitosan-Quince Seed Gum Hydrogels Encapsulated with Curcumin Loaded-Halloysite Nanotubes Designed for Tissue Engineering Application. *International Journal of Biological Macromolecules* **2021**, *177*, 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.113>.
- (122) Zhang, Z.; Feng, Y.; Wang, L.; Liu, D.; Qin, C.; Shi, Y. A Review of Preparation Methods of Porous Skin Tissue Engineering Scaffolds. *Materials Today Communications* **2022**, *32*, 104109. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104109>.
- (123) Ahmed, A.; Niazi, M. B. K.; Jahan, Z.; Ahmad, T.; Hussain, A.; Pervaiz, E.; Janjua, H. A.; Hussain, Z. In-Vitro and in-Vivo Study of Superabsorbent PVA/Starch/g-

C₃N₄/Ag@TiO₂ NPs Hydrogel Membranes for Wound Dressing. *European Polymer Journal* **2020**, *130*, 109650. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109650>.

(124) Lin Zhu; Lu Feng; Haixi Luo; Rong-shu Dong; Ming-yan Wang; Guanglong Yao; Jian Chen. Characterization of Polyvinyl Alcohol-Nanocellulose Composite Film and Its Release Effect on Tetracycline Hydrochloride. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115723>.

CAPÍTULO IX: ANEXOS

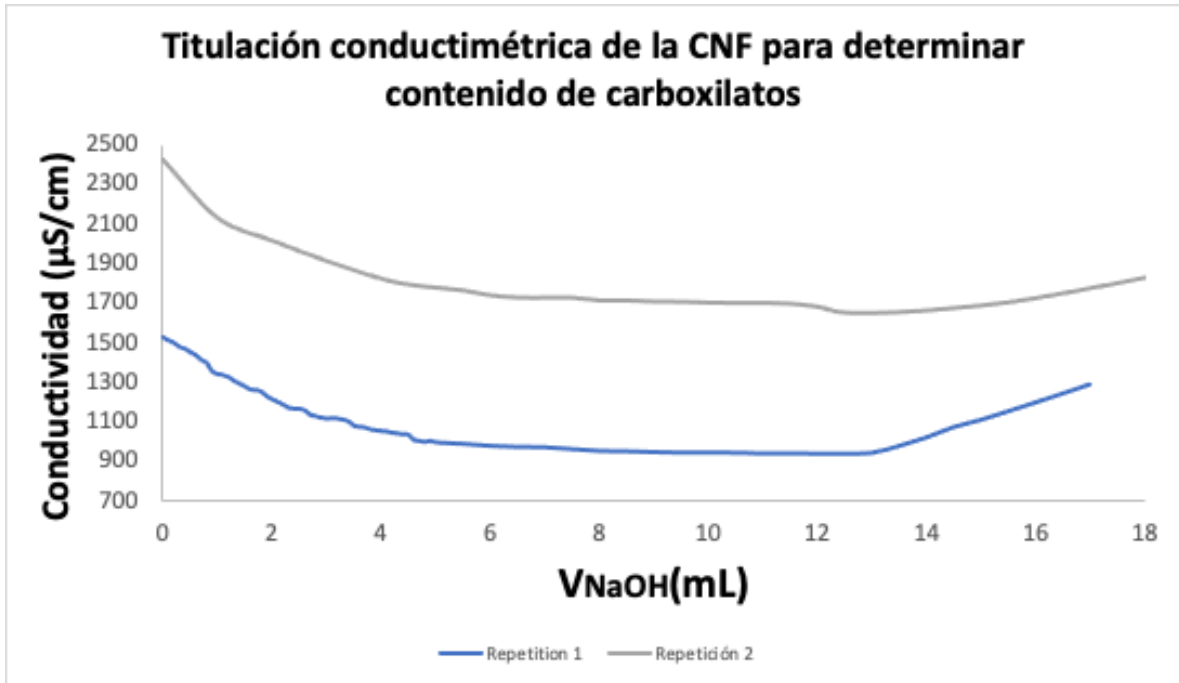


Figura 17. Titulación conductimétrica de la CNF con hidróxido de sodio 0,04 M

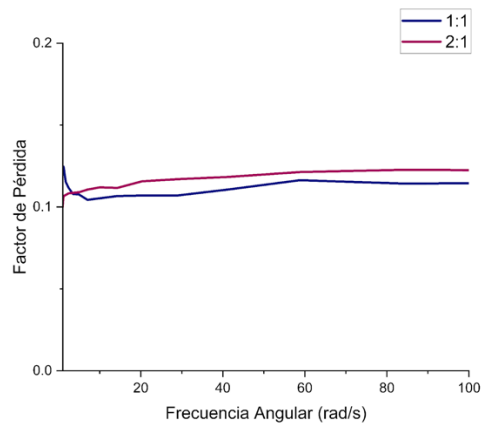


Figura 18. Factor de pérdida en función de la frecuencia angular de los hidrogeles CNF:PVA

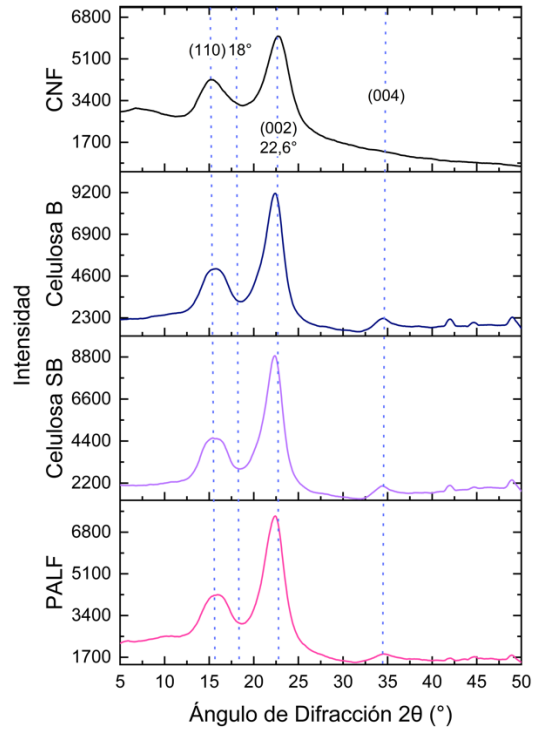


Figura 19. Difractogramas XRD de las muestras de rastrojo de piña (PALF), celulosa sin blanquear (Celulosa SB), celulosa blanqueada (Celulosa B) y CNF

Cuadro 11. Señales típicas para celulosa tipo I (122, 123)

2θ	Plano
16°	(110),
$22,6^\circ$	(002)
34°	(004)