



Fabricación avanzada de productos manufactureros
tradicionales mediante tecnologías de Additive
Manufacturing

E2.3. Informe técnico de las formulaciones desarrolladas para el sector calzado y de sus características.

Fecha entregable: 31/Octubre/2016



Unión Europea

Fondo Europeo
de Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| 1. INFORMACIÓN DEL PROYECTO. | 3 |
| 2. DETALLES DEL ENTREGABLE. | 4 |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 4. BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE ADITIVOS FUNCIONALES. | 6 |
| 5. FUNCIONALIZACIÓN DE FILAMENTOS..... | 11 |
| 6. EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS, ANTI FÚNGICAS Y CITOTOXICIDAD.. | 11 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 22 |
| 8. ANEXO | 22 |

1. INFORMACIÓN DEL PROYECTO.

Título del proyecto: Fabricación avanzada de productos manufactureros tradicionales mediante tecnologías de additive manufacturing

Acrónimo: AMFAB-II

Programa de trabajo: IVACE. Ayudas dirigidas a centros tecnológicos de la Comunidad Valenciana para 2016 (IMDECA2016/3).


Fecha de comienzo: 1 de Enero de 2016

Duración: 12 meses

Lista de participantes:

| Participante No. | Nombre organización participante. | Nombre abreviado | Lugar |
|------------------|---|------------------|-------|
| 1 (Coord.) | Asociación de Investigación de la Industria del Juguete, Conexas y Afines | AIJU | Ibi |
| 2 | Instituto Español del Calzado y Conexas | INESCOP | Elda |
| 3 | Instituto Tecnológico textil | AITEX | Alcoy |

2. DETALLES DEL ENTREGABLE.

| | |
|-------------------------------|---|
| Entregable número: | E2.3 |
| Título del entregable: | Informe técnico de las formulaciones desarrolladas para el sector calzado y de sus características. |
| Periodo: | 03/2016 - 10/2016 |
| Paquete trabajo: | PT2. Preparación de las formulaciones funcionales para los sectores juguete, textil y calzado |
| Tarea: | Tarea 2.3.- Obtención y caracterización de formulaciones funcionales para el sector calzado. |
| Autor: | <p>Instituto Tecnológico del Calzado y Conexas</p>  <p>INESCOP INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL CALZADO Y CONEXAS</p> |
| Resumen: | Informe técnico de las formulaciones desarrolladas para el sector calzado y de sus características. |

3. INTRODUCCIÓN

Una vez caracterizados diversos filamentos flexibles comerciales (EVA, PU, SBS, SEBS,...) en la primera anualidad, seleccionando los polímeros base óptimos en cuanto a propiedades reológicas, mecánicas y de confort, en este PT se pretenden desarrollar formulaciones funcionalizadas para su uso como plantilla para calzado con cierto valor añadido. Para ello, se han llevado a cabo diversas tareas de búsqueda y selección de aditivos funcionales para su incorporación a los filamentos termoplásticos dado que algunas muestras de polímero base seleccionadas como filamento termoplástico para la impresión 3D de material de plantilla para calzado, fueron descartadas en la primera anualidad, por su imposibilidad de ser extruídas o por la irregularidad obtenida durante la extrusión, en esta segunda anualidad se trabajará con las formulaciones óptimas como punto de partida para su funcionalización. Durante la segunda anualidad, estos materiales se han funcionalizado a través de la aditivación en fundido, mediante extrusión-compounding, para alcanzar una elevada homogeneidad de la mezcla y adecuada dispersión de los aditivos.

Actualmente existen en el mercado un gran número aditivos funcionales capaces de impartir nuevas funcionalidades y propiedades mejoradas a los materiales poliméricos, mostrando así un valor añadido. Sin embargo, tras una búsqueda por el mercado actual (nacional e internacional) se concluye que dichos aditivos deben cumplir ciertas regulaciones, tanto en materia de seguridad laboral como medioambiental, para cumplir con los requisitos establecidos, especialmente si va a ser incorporado a materiales para plantillas para calzado. Además, el aditivo debe incorporarse garantizando una distribución uniforme dentro de la matriz polimérica. En este sentido, un aditivo funcional debe presentar los siguientes requerimientos:

- Que sea fácil de dispersar en el polímero.
- Debe mejorar las propiedades finales.
- Debe facilitar el procesamiento polímero + aditivo.
- No ser tóxico.
- No desarrollar efectos secundarios.

4. BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE ADITIVOS FUNCIONALES.

En INESCOP se ha llevado a cabo una búsqueda de aditivos que, una vez incorporados a los filamentos, impartan al material de plantilla para calzado, las funcionalidades propuestas: propiedades antimicrobianas, propiedades biodegradables y efecto antiestático/conductor.

ADITIVOS FUNCIONALES ANTIMICROBIANOS

En relación con aditivos que impartan propiedades antimicrobianas, se han seleccionado aquellas muestras que tienen un amplio espectro de acción, estabilidad térmica, liberación controlada y tamaño de partícula idóneos para ofrecer una mayor eficacia. A continuación se muestran algunas hojas técnicas de los productos encontrados en el mercado actual.

Technical Product Information

Sanitized® MB PUR 22-61

Description Sanitized® MB PUR 22-61 is a concentrate of antimicrobial additives in a TPU carrier.

Physical form Pellets

Applications Sanitized® MB PUR 22-61 can be used in extrusion and injection moulding of polyurethane.

Typical properties Sanitized® MB PUR 22-61 has a reliable static effect against a large number of microorganisms:
Gram positive and gram negative bacteria
Yeasts
Fungi and mold

Benefits Highly effective and durable protection against bacterial and fungal attack.
Good leach resistance.
Reliable material protection.
Safe handling.

Microbiological Tests In order to check the antimicrobial effectiveness of the treated materials, the following test methods are recommended:
Agar diffusion Bacteria, mold fungi, mildew, yeasts
Germ count test Bacteria
Test for mildew resistance Mold fungi, mildew

En Unternehmen der MAP Group

TDS

Create : 2014. 10. 14
Trade name: **Universal-functional batch, germ-reducing**

Manufacturer / Supplier: Heroc GmbH & Co. KG
Molzener Str. 6a
12277 Berlin
Telephone: +49(0)30 / 755121803

Physical state : granules
Colour : beige

Handling : Application specific
The dosage must be defined in each individual case
Recommended initial concentration: 3to 6 wp. %
If necessary, dry 4 hours before processing at 50 ° C

Opened containers consume immediately!

Cross-reactions are possible

Universal Batch are not considered hazardous materials.
As with any hot material, care should be taken to protect the hands and other exposed parts of the body. When resins are overheated, more extensive decomposition may occur. Adequate ventilation should be provided to remove fumes from the work area. Resin pellets can be a slipping hazard. Loose pellets should be swept up promptly to prevent falls.

TDS 20.60160
Revisión: 13/09/2011

Parque Tecnológico Tecnópolis Pinar 27
11700 El Puerto de Santa María - Cádiz
TEL: 956477218 Fax: 956549474

Hoja de Datos Técnicos

HITEMA 60160 AM

HITEMA 60160 AM es un masterbatch con efecto antimicrobiano en base Polietileno, efectivo contra hongos, algas y bacterias.

Aplicaciones:

- Films de PE.

Dosis:

- 4,0 – 8,0% en las capas externas. La dosis depende del espesor del film, de la capacidad de producción y de los tratamientos superficiales.

Características:

- Previenen y frenan el crecimiento y propagación de los microorganismos.
- Inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positiva (*Bacillus* sp, *Corynebacterium* sp, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, entre otras) y Gram-negativas (*Enterobacter* sp, *Escherichia Coli*, *Klebsiella* sp, *Pseudomonas* sp, *Salmonella* sp, entre otras).

Embalaje:

- Sacos de PE de 25 Kg. / Palets de 1250 Kg.

Almacenaje:

- 9 meses a una temperatura de 30 °C.
- Una vez que el saco esté abierto, el contenido debería de ser usado lo más pronto posible y el saco debería de ser herméticamente cerrado con el objetivo de evitar su contacto con el aire.

Aplicación para el contacto con el alimento
HTM masterbatches cumple muchas directivas específicas relativas a los materiales que se utilizarán en los envases de los productos alimenticios. La confirmación oficial del cumplimiento de los requisitos vigentes en los distintos países puede ser emitida.

Salud y Seguridad
Las hojas de datos de seguridad de materiales están disponibles y deben ser consultados antes de la manipulación y el uso de masterbatches HTM.
La información contenida en este boletín técnico es correcta en el mejor de nuestro conocimiento, aunque no trata de describir cada posible condición de uso de este masterbatch.

Nanobiomatters BactiBlock, S.L.
Parque Tecnológico, C/ Louis Pasteur, 11 Nave-9
46800 - PATERNÀ, (SPAIN)
Tel. +034 96 131 86 23
www.nanobiomatters.com

Ficha Técnica

BactiBlock® 101 R1.43

BactiBlock® 101 R1.43 es un aditivo antimicrobiano para uso en una gran variedad de materiales poliméricos. Este aditivo está especialmente diseñado para ser incorporado antes, durante o después del proceso de manufacturación para proporcionar actividad antimicrobiana a los productos manufacturados. BactiBlock® 101 R1.43 evita el crecimiento de algas, mohos, hongos y de toda bacteria que cause malos olores, decoloración, manchas, deterioro o corrosión. Al incorporarlo en artículos tratados, sin embargo, no se protege al usuario de las bacterias, virus, gérmenes u otros organismos que puedan encontrarse en la comida o que puedan causar enfermedades. Puede ser empleado en la fabricación de polímeros, pinturas y productos de plástico y de látex.
BactiBlock® 101 R1.43 es una bentonita organomodificada con plata, cuyo proceso de fabricación se basa en la tecnología desarrollada y patentada por Nanobiomatters y propiedad de la compañía.

El contenido en plata de BactiBlock® 101 R1.43 es de 0.5%. Para la mayor parte de los plásticos, el aditivo se puede incorporar en el producto final hasta un máximo del 5.0% en peso o en un mínimo del 0.1%. Contacte con Nanobiomatters BactiBlock S.L. para determinar la cantidad correcta de BactiBlock® en cada caso concreto.

PROPIEDADES FÍSICAS

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Forma | Polvo |
| Color | Bianco |
| Olor | No |
| Densidad aparente | Aprox. 0,23 g/cm³ |
| Temperatura de descomposición | ~210 °C |

Información de Regulación
El producto y las aplicaciones aquí descritas pueden requerir registros y notificaciones locales o globales del producto para el inventario de los listados químicos, o para el uso en materiales de contacto alimenticio, cosméticos o aplicaciones médicas.

Información de Seguridad
El producto aquí descrito requiere precauciones de manejo. La información relativa a la seguridad y precauciones para el uso del material se incluye en las correspondientes Fichas de Datos de Seguridad (MSDS).

Sin embargo, tras la búsqueda de aditivos funcionales antimicrobianos se descartan algunos por su elevado precio, otros por su dificultad en el mercado para adquirirlo, otros por incompatibilidad con la base polimérica del filamento, etc. De este modo, se selecciona como aditivo funcional antimicrobiano el BIOMASTER 1306, que a continuación se muestra:

Biomaster 1306

Technical Data Sheet


Biomaster 1306 is an antimicrobial masterbatch developed for use in Thermoplastic Polyurethanes (TPU). The inorganic nature, small particle size and high temperature tolerance of this additive makes it ideal for use in a wide range of polymer processes.

Biomaster utilises silver ion technology with a range of carriers. This provides a release of silver ions on demand, safely inhibiting bacterial growth. The slow release of the active silver ingredient give the products maximum long term activity. Biomaster antimicrobial additives can be processed at temperatures up to 600 degrees Celsius without losing their antimicrobial properties.

Physical properties
Appearance - off-white pellets
Particle size and shape -2-3mm cylindrical
Solubility in water - essentially insoluble

Recommended addition rates
 Biomaster 1306 is recommended for use at levels from 1% for antimicrobial protection.

Testing procedure
 All testing is undertaken independently by Industrial Microbiological Services Limited. The procedure is a quantitative test designed to assess the performance of antimicrobial



properties. Submitted samples are challenged against stock cultures and incubated for 24 hours at 37°C according to ISO standards. TVC (Total Viable Count) of bacteria are then recorded and the percentage of reduction is calculated.

Biomaster efficacy
 Biomaster has been tested to ISO 22196:2011 against common organisms such as:

- Campylobacter
- E.coli
- Listeria
- MRSA
- Pseudomonas
- Salmonella

It is proven to reduce the growth of these bacteria by up to 99.99%.


Regulatory
 The active ingredient complies with the required legislation for biocides. This can include:

- Biocidal Products Regulation (BPR)
- Food and Drug Administration (FDA)
- Environmental Protection Agency (EPA).

General information
 Biomaster 1306 is easily added to the product during manufacture. Biomaster only imparts antimicrobial properties and should not affect the basic colour or surface finish of any product in which it is used. The active ingredient in Biomaster cannot leach or wash out and is designed to last for the lifetime of the product. Before using this product please ensure that you have the latest information. For help or more information contact the Addmaster technical team - email info@addmaster.co.uk.

Storage and handling
 Biomaster products are formulated for maximum stability in storage and in use. However, materials containing silver exhibit varying degrees of light sensitivity and can cause some discolouration in the finished article. It is therefore incumbent upon the user of the Biomaster products to evaluate them fully under their normal conditions of use. As with all chemicals, please refer to the Materials Data Handling Sheet prior to use.

This information is provided in good faith and every reasonable effort is made to ensure that it is accurate and up to date. Addmaster (UK) Ltd. shall not be liable for any damage arising, directly or indirectly, from the use of the information contained herein. It is issued on the condition that the user will determine the safety and suitability of this product for their purpose prior to use. Regulations are country-specific and local information should be sought before placing your product on the market.



ADITIVOS FUNCIONALES BIODEGRADABLES

Generalmente, tanto las matrices poliméricas como los aditivos empleados para la mejora de sus propiedades provienen de recursos fósiles agotables y no biodegradables. Esta fuerte dependencia con respecto a los combustibles fósiles, como el petróleo, contribuye negativamente al medio ambiente. En este sentido, actualmente existe una tendencia dirigida hacia la sostenibilidad de productos que minimizan el uso de recursos petrolíferos, sin empeorar por ello, sus prestaciones. Concretamente, se ha llevado a cabo una búsqueda de aditivos funcionales que resulten potencialmente biodegradables que se muestran a continuación.

Lubrizol
Engineered Polymers (TPU)
Pearthane™ ECO* TPU (Thermoplastic Polyurethane)

Pearthane ECO is the flagship product under the Bio-TPU™ by Lubrizol (link to Bio-TPU technology page) product offering. Originally developed by Iriogorria, Pearthane ECO is the first bio-based* TPU (thermoplastic polyurethane) to not compromise on high-performance when compared to traditional petroleum-based TPUs. Its outstanding mechanical, physical and chemical properties offer significant flexibility in a wide-range of applications including:

- Highly flexible films
- Abrasion resistance hoses
- Soft touch injection molded parts
- Special compounds

Pearthane ECO is made up of block copolymers consisting of a sequence of polyol soft segments and hard polyurethane bridges the gap between thermoplastics and rubbers and can be used pure, as an additive or in blends with other polymers.

| Product Name | Resin Code | Availability | Technical Data Sheet |
|-----------------------|------------|--------------|----------------------|
| Pearthane™ ECO D12788 | 85A | | Existed |
| Pearthane™ ECO D12789 | 84D | | Existed |
| Pearthane™ ECO D12790 | 82A | | Existed |
| Pearthane™ ECO D12791 | 82A | | Existed |
| Pearthane™ ECO D12792 | 85A | | Existed |
| Pearthane™ ECO D12793 | 81A | | Existed |
| Pearthane™ ECO D12794 | 81A | | Existed |
| Pearthane™ ECO D12795 | 81A | | Existed |

Lubrizol
Engineered Polymers

Pearbond™ 520

Pearbond™ 520 is a linear, polycaprolactone-copolyester polyurethane, supplied in form of white spherical granules with a very high crystallization rate and a very high thermoplasticity level.

PRODUCT SPECIFICATION

| | | | |
|-----------------------------------|---------|----------|----------|
| Melt Flow Index (170°C / 2.16 Kg) | 15 - 30 | g/10 min | ISO 1133 |
|-----------------------------------|---------|----------|----------|

PRODUCT CHARACTERISTICS *

| Property | Typical values * | Method |
|------------------------|------------------------|----------|
| Density @ 20°C | 1.19 g/cm ³ | ISO 2781 |
| OH Value | < 3 mg KOH/g | MQSA 474 |
| Moisture Content | < 0.15 % | MQSA 44 |
| Crystallization | 0 - 11 min. | MQSA 12A |
| Melt Viscosity @ 130°C | 1,350 Pa.s | ISO 1133 |
| Melting Point | 86 ± 2 °C | MQSA 70A |
| Thermoplasticity | Very High | MQSA 68A |

*These typical values provide general information, not for use as product specification.

APPLICATIONS
Pearbond™ 520 can be added to formulations of REACTIVE POLYURETHANE HOT-MELTS (HMPUR), in order to improve the crystallisation speed.

HEALTH AND SAFETY
A safety data sheet on Pearbond™ 520 is available, with all safety information. The usual safety practices in the handling of chemicals should be observed, i.e.: good ventilation in the working area, gloves and protective goggles.

Se han evaluado las propiedades reológicas de estos aditivos funcionales (ECOTPU 520 Y 590) biodegradables y los resultados muestran que son compatibles con la matriz polimérica del filamento (TPU):

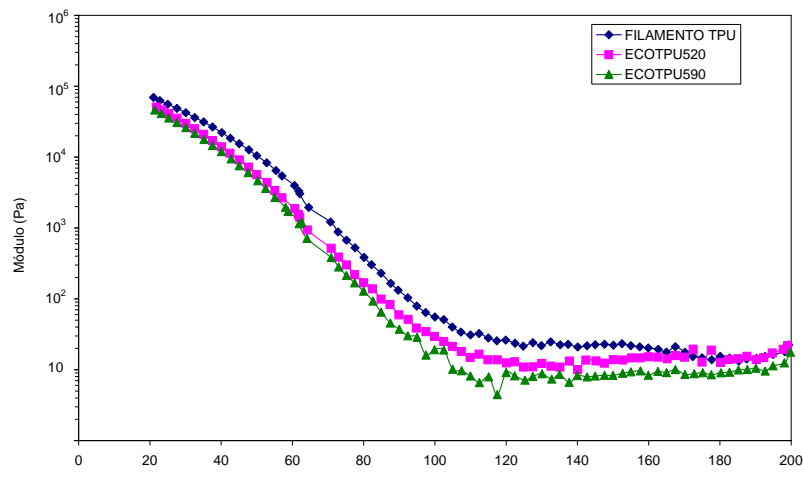


Figura 1. Propiedades reológicas del filamento TPU y los aditivos funcionales biodegradables.

ADITIVOS FUNCIONALES ANTIESTÁTICOS/CONDUCTORES

La acumulación de carga eléctrica “descontrolada” constituye un importante riesgo laboral en muchos sectores de la industria, más concretamente en aquellas situaciones en las que están presentes materiales altamente inflamables, explosivos, en la manipulación de productos pirotécnicos, etc. Adicionalmente, el cuerpo humano es un buen conductor, y en ambientes con humedad relativa baja, acumula cargas electrostáticas que dan lugar a un potencial de varios miles de voltios. Por tanto, debido al significativo riesgo de ignición existente en estas situaciones laborales por la acumulación de carga eléctrica, los trabajadores deben equiparse con calzado de seguridad adecuado, esto es, calzado antiestático o conductor que favorezca que la corriente circule a través del cuerpo humano y descargue a tierra. Así la energía que se pueda acumular en su cuerpo, se perderá por el contacto con el suelo. Igualmente, los operarios deben vestir con ropa que permita disipación de las cargas eléctricas que pudieran acumularse en ellos.

Se ha llevado a cabo una búsqueda de aditivos funcionales que impartan carácter antiestático/conductor que se muestran a continuación:

htm
htmsterbatch
Parque Tecnológico Reina de Calles Parvella 27
11500 El Puerto de Santa María - Cádiz - SPAIN
TEL: +34 956 477818. Fax: +34 956 549474.

TDS No. 60760
Update: 05/12/2012

HITEMA 60760 AT

HITEMA 60760 AT es un masterbatch antiestático que contiene una mezcla de aditivos de efecto rápido y larga duración estabilizados en una base de polietileno.

Aplicaciones

- Masterbatch de larga duración especialmente indicado para film de LDPE y LLDPE, que mejora notablemente la procesabilidad en máquinas automáticas de alta velocidad, debido a la combinación de agentes antiestáticos de baja y alta migración.
- Efecto mínimo sobre las propiedades ópticas.

Dosis

- Entre el 2.0 y el 4.0%, dependiendo del efecto deseado. No obstante se recomienda al cliente ajustar la dosis del producto dependiendo de su experiencia y proceso. No dude en contactar con nuestro Departamento Técnico en caso de duda.

Características

- Facilita la disipación de las cargas electrostáticas en combinación con la humedad atmosférica, formando una película conductiva sobre la superficie plástica.
- La combinación de aditivos que contiene ha sido especialmente desarrollada para no empeorar las propiedades ópticas del film.
- HITEMA 60760 AT presenta excelentes propiedades antiestáticas (resistividad superficial y half decay time)
- Empleado en bajas dosis, prácticamente no afecta a la impresión ni a la sellabilidad del film.

Embalaje

- El producto se suministra contenido en sacos de polietileno de 25 Kg. Palets de 1.250 Kg de peso neto.

Almacenaje

- Almacenar en lugar seco, libre de humedad. Durante su almacenamiento mantener alejado de altas temperaturas. Bajo las condiciones apropiadas el producto puede almacenarse durante 9 meses.

avanzare
nanotechnology

LOW COST
multifunctionality

avanSTATIC

Product Introduction

Avanzare has developed low cost highly efficient nanoparticles to obtain from anti-static, ESD to conductive materials. The combination of our nanomaterials produces interaction between the particles to obtain percolation effect. We have solutions for different rates of conductivity :

- <100 MOhm
- <1 MOhm
- <200 KOhm
- <10 KOhm

Avanzare anti-static, ESD and conductive materials based on nanotechnology can be used in various types of materials. Nowadays we have already adapted them to several types and we can adapt them to new ones:

- Polyurethanes
- Thermoplastics: PP, ABS, TPU, EVA...
- PVC
- Rubber
- Composites
- Fabrics
- ...

We have also formulations in solid or in liquid form; such as dispersions in water or polyol

IZANE Innovación Tecnológica SL - C/ Antonio de Nebrija, 6 - 26009 Logroño La Rioja, Spain - www.avanzare.es - Tel: +34 941 587 027 - Fax: +34 941 589 143

Sin embargo, tras la búsqueda de aditivos funcionales antiestáticos se descartan algunos por su elevado precio. De este modo, se selecciona como aditivo funcional el PLASTICYL TPU que consiste en un masterbatch de TPU con nanotubos de carbono, que a continuación se muestra:



PLASTICYL™ TPU1001
Technical Data Sheet

General Information

Description

PLASTICYL™ is a family of Multi-Wall Carbon Nanotubes (MWNT) thermoplastic concentrates for applications requiring superior electrical conductivity and electrostatic discharge (ESD) properties. PLASTICYL™ TPU1001 is a conductive masterbatch based on thermoplastic polyurethane. Because of its high flow, PLASTICYL™ TPU1001 is ideal for both injection molding and extrusion processes.

Key Applications

- Tubes and pipes extrusion
- Conveyor belts
- Extruded films

Benefits

- Excellent electrical conductivity at low loading
- Retention of key mechanical properties
- Ease of processing
- Better abrasion properties
- High cleanliness

Technical Data

Main Characteristics

| CARBON NANOTUBES LOADING (%wt) | REAL DENSITY (G/L) 150 1183 | MFI (G/10 MIN) NON-STANDARD TEST: 190°C ; 8,7 kg ; 4 mm |
|--------------------------------|--------------------------------|---|
| 10 ± 1,0 | - | 4.75 |

Se han evaluado las propiedades reológicas y los resultados muestran que son compatibles con la matriz polimérica del filamento (TPU). Además se produce una mejora de dichas propiedades y un aumento de conductividad eléctrica.

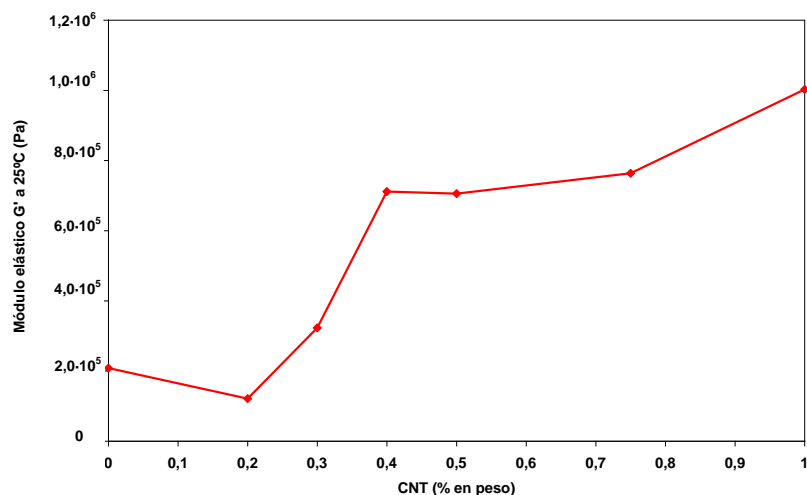


Figura 2. Propiedades reológicas de los aditivos funcionales conductores.

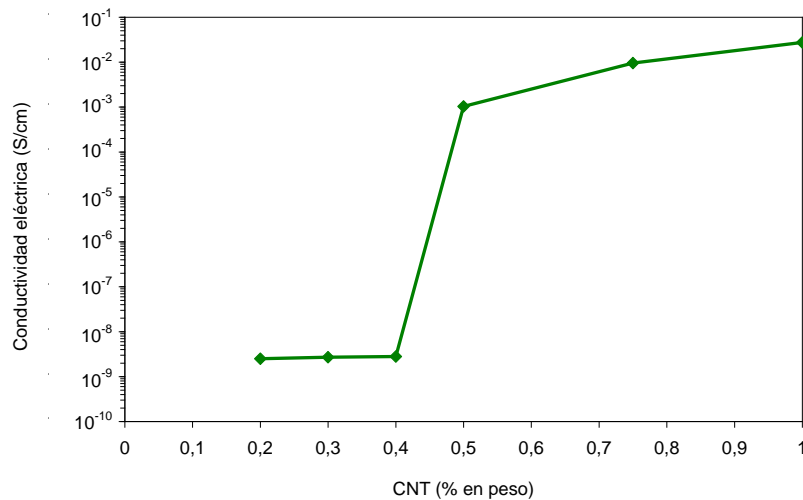


Figura 3. Propiedades conductoras de los aditivos funcionales conductores.

5. FUNCIONALIZACIÓN DE FILAMENTOS

Se incorporaron los aditivos funcionales seleccionados a los filamentos mediante extrusión/aditivación en fundido. Adicionalmente, se ha estudiado la cantidad óptima a incorporar en el filamento para que imparta las propiedades deseadas en la plantilla. Se trata de un parámetro importante que influye notablemente en los resultados finales del proyecto: la cantidad de aditivo funcional incorporado (consecuentemente el precio final de la plantilla), influye en la estructura y propiedades que adquiera el filamento.



6. EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS, ANTI FÚNGICAS Y CITOTOXICIDAD

Se ha realizado un estudio de diferentes tipos de ensayos microbiológicos para determinar las propiedades antimicrobianas y su citotoxicidad. Debido a que la funcionalización de estos materiales implica en la incorporación de los compuestos antimicrobianos en sus hilos y que estos materiales se quedan firmemente adheridos, se ha determinado que, entre los diferentes ensayos antimicrobianos existentes, los que más se adaptan a estas características son los ensayos antimicrobianos ISO16187 para bacterias, ISO.NP:20150 para hongos y el ensayo ISO10993-5:2009 para evaluar el efecto citotóxico de estos materiales.

ENSAYOS ANTIMICROBIANOS

Hasta hace poco para realizar ensayos antimicrobianos para calzado y componentes se empleaban normas derivadas para textiles y principalmente para plásticos. Actualmente existe una norma aprobada para determinar la eficiencia antibacteriana de materiales específicos para calzados y componentes: ISO 16187:2013. Esta norma permite evaluar prácticamente todos los materiales presentes en calzados, excepto los metales. Está formada por 3 metodologías distintas que engloban tanto materiales absorbentes como no absorbentes, y está indicada principalmente para materiales antimicrobianos que no difunden en el medio.

De la misma forma, el proyecto de norma ISO.NP.20150 es un borrador de norma que se está desarrollando para evaluar el efecto fungicida en materiales específicos para calzados y componentes del calzado. También es una norma pensada para materiales antifúngicos incorporados que no difunden en el medio y que permite tener una estimativa porcentual del efecto fúngico de un dado compuesto frente a diferentes cepas de hongos. El método presenta similitudes con el ISO16187 y está pensado para materiales absorbentes y no absorbentes y que dependiendo de esta propiedad se realiza un método estático o dinámico.



Figura 4 - Preparación de las muestras según norma ISO16187:2013.

ENSAYOS CITOTOXICIDAD

El empleo tanto de aditivos como de polímeros que van a formar parte de componentes de calzado, artículos que se utilizan en contacto con la piel del usuario durante periodos largos de tiempo, o que contactan con la misma repetidamente, requiere no sólo la demostración de las propiedades añadidas de los mismos (antimicrobianas u otras), sino también la comprobación de que su empleo no va a producir, a priori, efectos negativos en la salud de la piel de los usuarios.

Si bien los aditivos funcionales que han sido seleccionados para su aplicación a los diferentes polímeros cumplen, entre otros criterios, con la ausencia de toxicidad, es necesario comprobar este aspecto una vez han sido incorporados a las matrices poliméricas, pues es posible que el

procedimiento de aplicación o posibles interacciones con las matrices pudieran modificar sus propiedades.

En este sentido, con el objetivo de poder establecer la ausencia de toxicidad en células de piel humana de los diferentes materiales funcionalizados, se empleará una norma de ensayo establecida (ISO 10993-5:2009, "Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro toxicity). Esta norma está diseñada para determinar la respuesta biológica de cultivos de células de mamífero mediante la valoración de diferentes parámetros biológicos, como la velocidad de crecimiento celular o los daños en los cultivos celulares. La norma permite evaluar un amplio rango de artículos y materiales. Cuando se trata de materiales sólidos, el daño se puede evaluar, bien exponiendo las células directamente a fragmentos de dichos materiales, aplicados en una proporción definida respecto a la superficie de cultivo celular, o bien de forma indirecta, a través de la obtención de extractos del material. Los extractos se obtienen poniendo en contacto las muestras con soluciones que pueden ser de diferente naturaleza (tampones, medios de cultivo, agua, etc.) y durante periodos de tiempo y temperaturas variables, en función de lo estricto que se quiera ser a la hora de comprobar la citotoxicidad. Las muestras, bien se trate de muestras sólidas o de extractos, son puestas en contacto con los cultivos celulares durante un periodo de tiempo establecido, generalmente 24h. Transcurrido este tiempo, el efecto de la exposición es valorada, bien cualitativamente o bien cuantitativamente, estableciéndose si existe una toxicidad del material y en qué grado.

Dado que la principal vía de exposición a los materiales funcionalizados a obtener en el proyecto es la dérmica, se ha determinado que los ensayos de citotoxicidad se realizarán empleando queratinocitos humanos, que son las células que constituyen la epidermis, y por tanto serán las más directamente expuestas a los mismos.

El procedimiento general a seguir para los materiales funcionalizados sería el siguiente:

- Un primer paso, que consiste en cortar las muestras, en caso necesario, para adaptar su tamaño y/o superficie a la del área de cultivo celular a emplear.
- Seguidamente se procede a la esterilización de las muestras. El proceso de esterilización varía en función de la tipología de muestra (si es termosensible, sensible a luz UV etc.), de modo que debe ser adaptado a cada tipo de muestra en particular.
- Una vez esterilizadas las muestras, se ponen en contacto con los cultivos celulares. Como sea mencionado más arriba, bien de forma directa (muestras depositadas directamente sobre la capa celular) o bien indirecta (diferentes diluciones de los extractos obtenidos).
- Transcurridas 24h de exposición en un incubador de cultivos celulares (37°C, 95%HR, 5% CO₂), los cultivos celulares son evaluados. Dependiendo del método concreto de evaluación, se estudian diferentes parámetros:
 - o Daño celular mediante evaluación morfológica.
 - o Medida del daño celular
 - o Medida del crecimiento celular
 - o Medida de aspectos concretos del metabolismo celular.
- Tras llevar a cabo la evaluación de los cultivos celulares expuestos mediante alguno de estos aspectos, se asigna un grado de citotoxicidad de 0 a 4 en el caso de los métodos

cuantitativos, o un porcentaje de citotoxicidad respecto a un material control en el caso de los métodos cuantitativos. Para los métodos cualitativos, un grado mayor de 2 determina que la muestra es citotóxica. Para los métodos cuantitativos, generalmente un porcentaje de citotoxicidad mayor de 30% define la muestra como citotóxica.

En primer lugar se analizó la citotoxicidad del **filamento base TPU sin aditivos (PU0)**, el cual ha sido extrusionado y mediante impresión 3D se ha obtenido una plantilla prototipo con este material. En ensayo se ha realizado según la norma UNE-EN ISO 10993-5: 2009, la cual describe el método para evaluar la citotoxicidad in vitro de productos sanitarios (u otros materiales) mediante la incubación de células cultivadas con los materiales correspondientes, bien por contacto directo o por difusión. Mediante la evaluación de determinados parámetros biológicos, se determina la respuesta de las células de mamífero expuestas a los materiales problema. El método empleado ha sido el Contacto Directo, con un periodo de exposición de 24 h. La línea celular empleada ha sido la HaCaT (queratinocitos humanos). Las células HaCaT se sembraron en placas Petri de 60 mm, y se cultivaron hasta el 80% de confluencia. El medio y condiciones de cultivo han sido las estándar para este tipo celular (Medio DMEM más L-glutamina, incubación a 37 °C, 5% CO₂). Para llevar a cabo el ensayo, el medio fue eliminado, y se añadió medio fresco. Cada muestra fue situada cuidadosamente en el centro de la placa Petri correspondiente. Las células se cultivaron durante 24h en presencia de las muestras, y la citotoxicidad fue evaluada de modo cualitativo. Se emplearon triplicados de cada muestra, además de una muestra control (sólo medio de cultivo). Las muestras fueron previamente esterilizadas mediante gradientes de etanol, para evitar la contaminación de las células durante la exposición a las mismas. El tamaño de las muestras corresponde a aproximadamente 1/10 de la superficie de cultivo, tal y como indica la norma.

Para la evaluación cualitativa de la citotoxicidad, las muestras fueron retiradas, y los cultivos celulares fueron examinados mediante un microscopio invertido. Se evaluaron aspectos como cambios morfológicos, vacuolización, despegue celular, lisis, integridad de las membranas y estado del núcleo. Además, los cultivos fueron teñidos con dos colorantes fluorescentes: SYTO9, que marca todas las células en verde, permitiendo distinguir sus detalles, y el colorante fluorescente PI (yoduro de propidio), que marca las células muertas o dañadas en rojo (Figura 2). El estado de las muestras fue graduado conforme a los siguientes grados de reactividad, de acuerdo a la norma empleada. Como indica la tabla 1, la evaluación fue realizada asignando valores al efecto del material ensayado sobre el cultivo celular, que abarcaron un rango desde "0" (sin efecto observable) hasta 4 (daño severo). Se considera citotóxica una muestra que alcance un valor mayor de 2.

Tabla 1. Grados de reactividad para el ensayo de contacto directo.

| Grado | Reactividad | Descripción de la zona reactiva |
|-------|-------------|---|
| 0 | Ninguna | No se detectan células alteradas ni debajo ni alrededor de la muestra |
| 1 | Ligera | Algunas células deformadas o degeneradas bajo la muestra |
| 2 | Media | Zona limitada al área bajo la muestra |
| 3 | Moderada | Zona que se extiende hasta 1,0 cm desde la muestra |
| 4 | Severa | Zona que se extiende más de 1,0 cm más allá de la muestra |

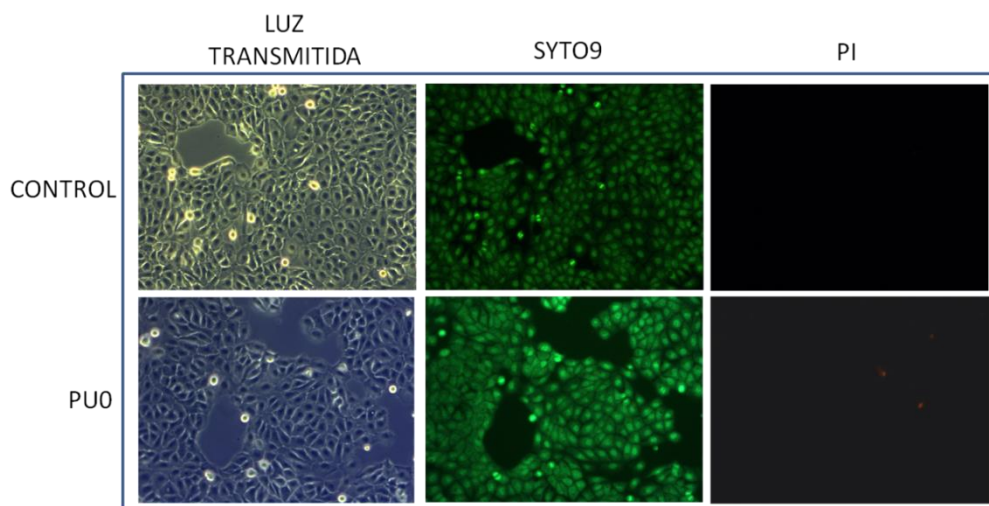


Figura 6. Microfotografías representativas de cultivos celulares expuestos al material de ensayo y teñidos con colorantes fluorescentes.

La Tabla 2 siguiente recoge los resultados obtenidos:

| MUESTRA | GRADUACIÓN EFECTO |
|---------|-------------------|
| Control | 0 |
| PUO | 1 |

La muestra **filamento base TPU sin aditivos (PUO)** presenta un grado de reactividad de **1 (algunas células deformadas bajo la muestra)**, considerándose por tanto que no es citotóxica. La tinción fluorescente confirma esta observación.

A continuación se muestran los resultados tras analizar el **filamento base TPU con el aditivo antimicrobiano BIOMASTER**, el cual ha sido extrusionado y mediante impresión 3D se ha obtenido una plantilla prototipo con este material. Se ha determinado la **actividad antibacteriana** evaluando el efecto de los diferentes tratamientos en cultivos de *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* tras 18 - 24 horas de crecimiento en diferentes condiciones:

Tabla 3. Pesos de las muestras de TPU funcionalizado y no funcionalizado.

| MUESTRA | mg de TPU | µg de Ag (1%) | K. pneumoniae (G-) |
|---------|-----------|---------------|--------------------|
| 1 | 105,3 | 1053 | sin efecto/crecido |
| 2 | 101,7 | 1017 | sin efecto/crecido |
| 3 | 49,8 | 498 | sin efecto/crecido |
| 4 | 51,7 | 517 | sin efecto/crecido |
| 5 | 13,5 | 135 | sin efecto/crecido |
| 6 | 12,7 | 127 | sin efecto/crecido |
| 7 | 108,9 | - | |
| 8 | 102,1 | - | |
| 9 | 51,4 | - | |
| 10 | 52,8 | - | |
| 11 | 13,3 | - | |
| 12 | 16,3 | - | |
| | | | |
| MUESTRA | mg de TPU | µg de Ag (1%) | S. aureus (G+) |
| 1 | 105,2 | 1052 | sin efecto/crecido |
| 2 | 103,7 | 1037 | sin efecto/crecido |
| 3 | 59,4 | 594 | sin efecto/crecido |
| 4 | 52,9 | 529 | sin efecto/crecido |
| 5 | 11,8 | 118 | sin efecto/crecido |
| 6 | 13,5 | 135 | sin efecto/crecido |
| 7 | 101,6 | - | |
| 8 | 102,0 | - | |
| 9 | 50,1 | - | |
| 10 | 51,6 | - | |
| 11 | 10,5 | - | |
| 12 | 11,6 | - | |
| 13 | 207,7 | 2077 | sin efecto/crecido |
| 14 | 204,5 | 2045 | sin efecto/crecido |

Se han realizado cultivos de 1,8 ml de NB en los cuales se ha inoculado 0.2 ml de cada cepa a una densidad óptica inicial de 0.1 (OD_{546nm}) y se ha evaluado para cada una de ellas las condiciones anteriormente descritas a 18-24 horas. El efecto antimicrobiano ha sido establecido mediante medida visual de la turbidez del cultivo. El crecimiento bacteriano se indica como “+” y la ausencia de crecimiento como “-“. El símbolo “+/-“ indica una muestra con crecimiento, pero inferior al control positivo (bacteria + medio de cultivo).

El filamento funcionalizado, cortado en fragmentos y 1 mm de espesor **NO presenta actividad antibacteriana** para ninguna de las bacterias testadas.

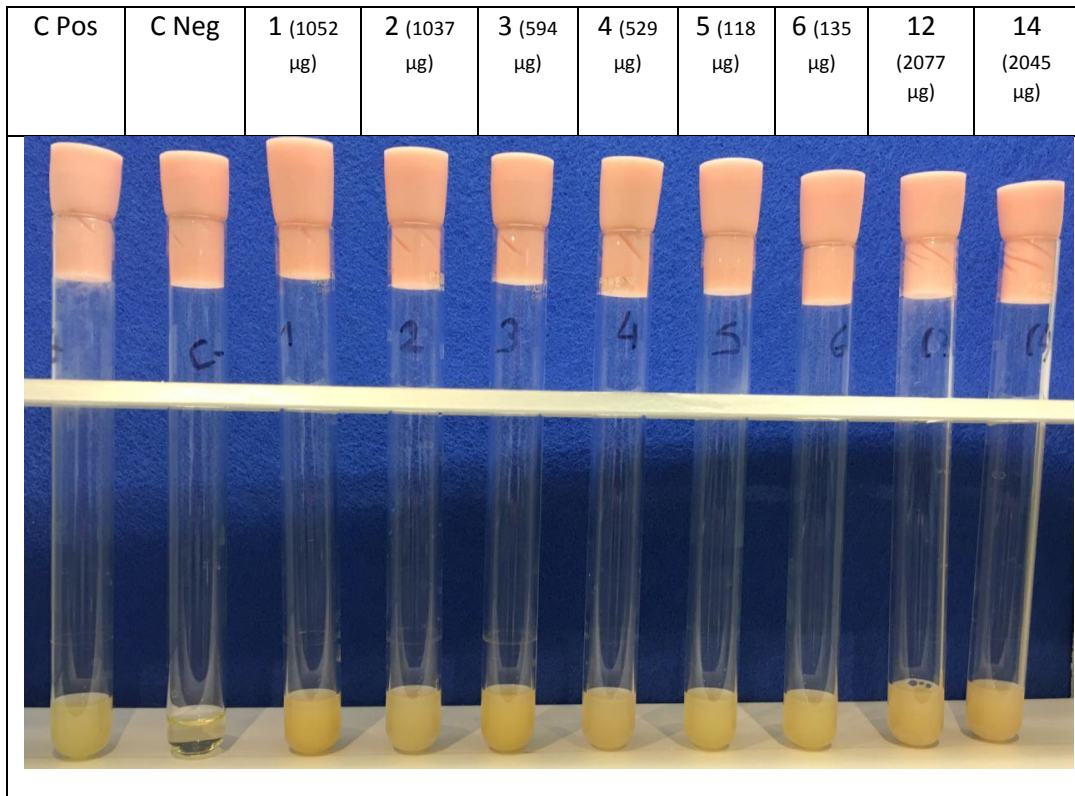


Figura 7. Muestras evaluadas en medio líquido de *Staphylococcus aureus* CECT 239 con diferentes pesos de TPU impregnados con nanoparticulas de Ag (de 1 a 6 – Funcionalizado).

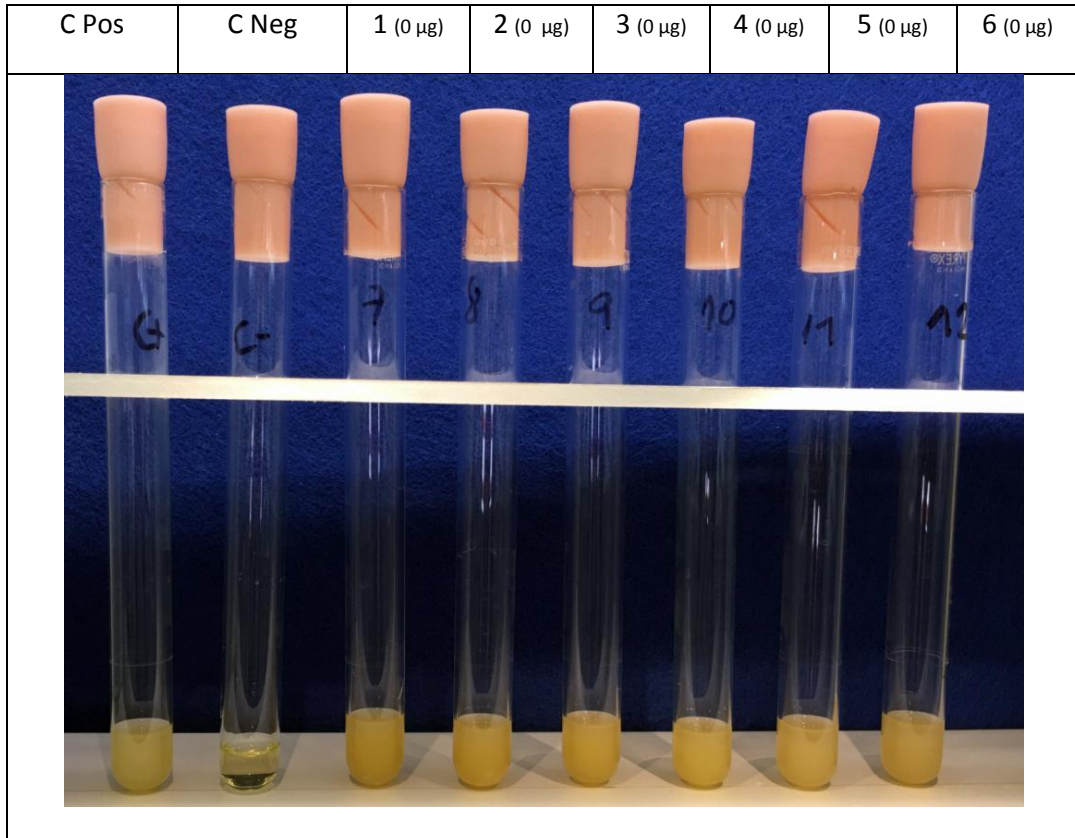


Figura 8. Muestras evaluadas en medio líquido de *Staphylococcus aureus* CECT 239 con diferentes pesos de TPU sin nanopartículas de Ag (de 7 a 12 - NO Funcionalizados)

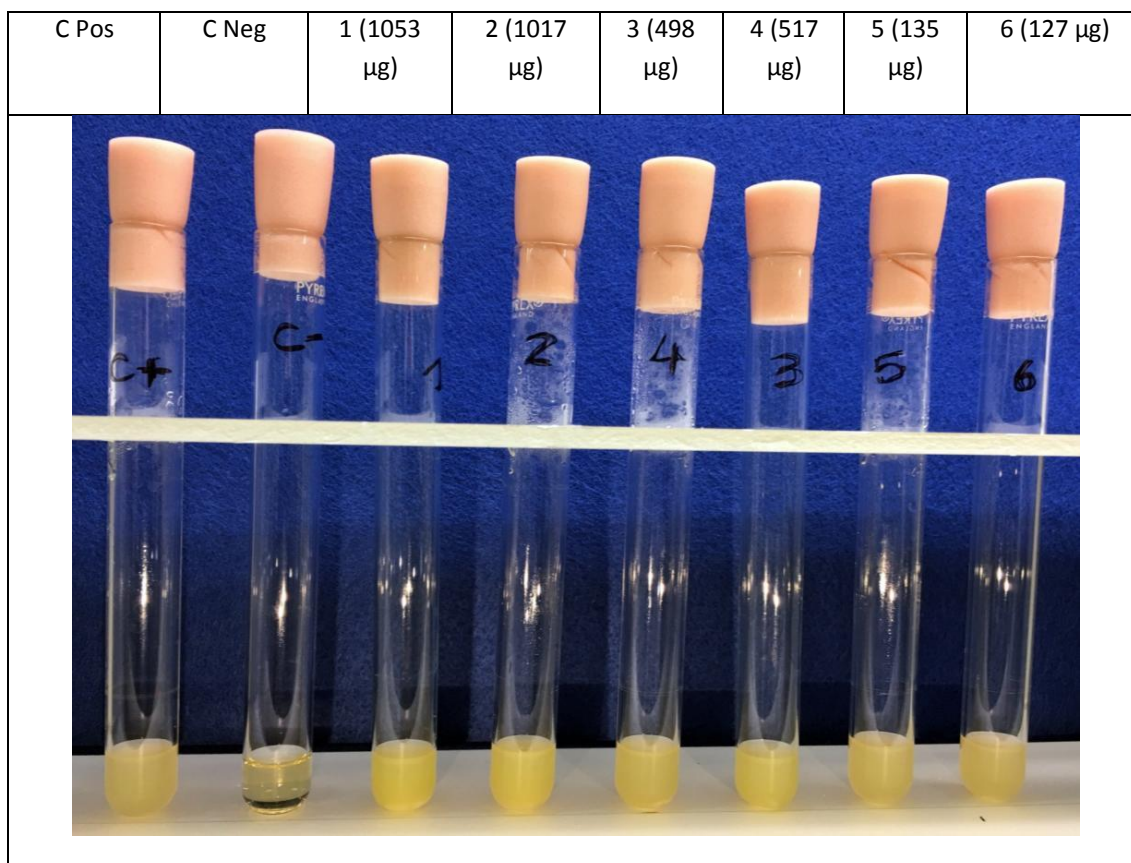


Figura 9. Muestras evaluadas en medio líquido de *Klebsiella pneumoniae* CECT141 con diferentes pesos de TPU impregnados con nanoparticulas de Ag (de 1 a 6 - Funcionalizado)

| | | | | | | | |
|-------|-------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| C Pos | C Neg | 7 (0 µg) | 8 (0 µg) | 9 (0 µg) | 10 (0 µg) | 11 (0 µg) | 12 (0 µg) |
|-------|-------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|

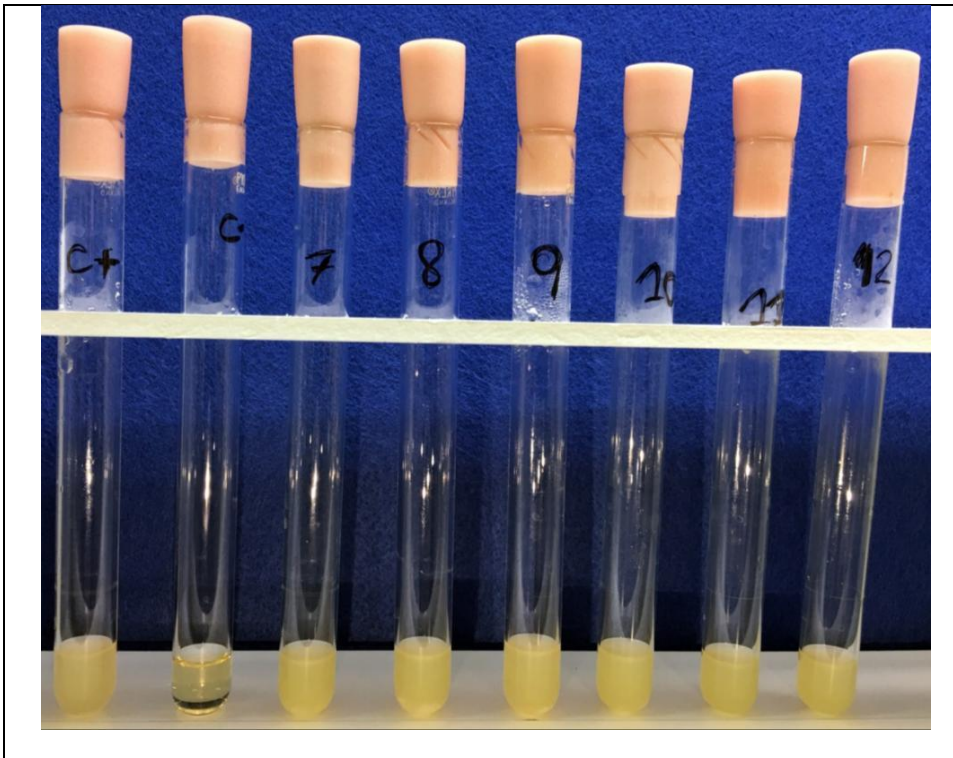


Figura 10. Muestras evaluadas en medio líquido de *Klebsiella pneumoniae* CECT141 con diferentes pesos de TPU sin nanopartículas de Ag (de 7 a 12 - NO Funcionalizados)

A continuación se muestran los resultados de citotoxicidad tras analizar el **filamento base TPU con el aditivo antimicrobiano BIOMASTER**, el cual ha sido extrusionado y mediante impresión 3D se ha obtenido una plantilla prototipo con este material. El ensayo se ha realizado según la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009 descrito anteriormente. Para la evaluación cualitativa, las muestras fueron retiradas, y los cultivos celulares fueron examinados mediante un microscopio invertido. Se evaluaron aspectos como cambios morfológicos, vacuolización, despegue celular, lisis, integridad de las membranas y estado del núcleo. El estado de las muestras fue graduado conforme a los siguientes grados de reactividad, de acuerdo a la norma empleada:

Tabla 4. Grados de reactividad para el ensayo de contacto directo.

| Grado | Reactividad | Descripción de la zona reactiva |
|-------|-------------|---|
| 0 | Ninguna | No se detectan células alteradas ni debajo ni alrededor de la muestra |
| 1 | Ligera | Algunas células deformadas o degeneradas bajo la muestra |
| 2 | Media | Zona limitada al área bajo la muestra |
| 3 | Moderada | Zona que se extiende hasta 1,0 cm desde la muestra |
| 4 | Severa | Zona que se extiende más de 1,0 cm más allá de la muestra |

Como indica la Tabla 4, la evaluación fue realizada asignando valores al efecto del material ensayado sobre el cultivo celular, que abarcaron un rango desde "0" (sin efecto observable) hasta 4 (daño severo). Se considera citotóxica una muestra que alcance un valor mayor de 2.

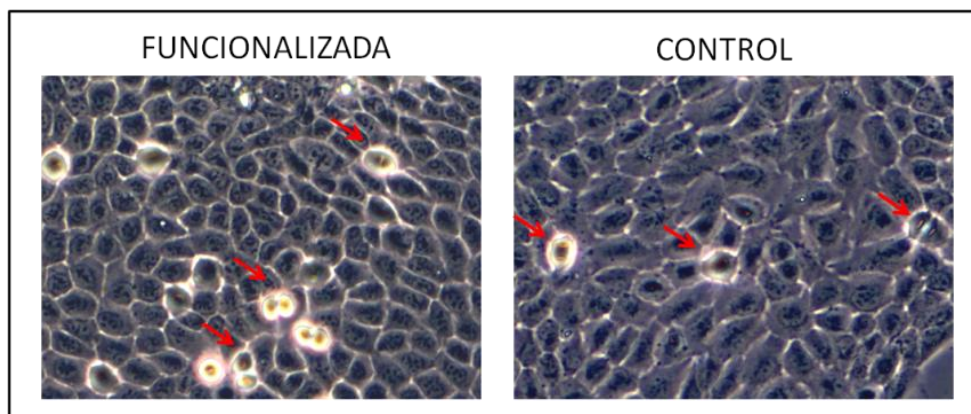


Figura 11. Microfotografías representativas de cultivos celulares expuestos al material de ensayo. Las flechas rojas indican células en proceso de división.

La tabla siguiente recoge los resultados obtenidos (Tabla 5):

| MUESTRA | GRADUACIÓN EFECTO |
|-------------------------|-------------------|
| Control | 0 |
| Material funcionalizado | 1 |

La muestra evaluada presenta un grado de reactividad de 1, observándose algunas células deformadas bajo la muestra. El resto de superficie de cultivo muestra células completamente sanas, observándose numerosas células en proceso de división. Se concluye que la muestra evaluada no es citotóxica.

Los informes realizados de citotoxicidad y antimicrobianos se incluyen en el ANEXO de este entregable.

7. CONCLUSIONES

Se han obtenido formulaciones funcionalizadas para la impresión en 3D de plantillas para calzado, con propiedades reológicas adecuadas de biodegradabilidad y conductoras. Por otro lado, las formulaciones desarrolladas no son citotóxicas. En cuanto a sus propiedades antibacterianas, el filamento base TPU con el aditivo antimicrobiano incorporado no muestra actividad antibacteriana.

8. ANEXO

ENSAYO CITOTOXICIDAD C-16098768

ENSAYO ANTIMICROBIANO C-16119303

**INFORME Nº:** C-16098768**ASUNTO:** Evaluación de comportamiento en filamentos
para impresión ·D. PROYECTO IVACE
AMFAB II**SOLICITANTE:** INTERIOR**I. MUESTRAS:**

Poliuretano termofusible (Ref. PU0) extrusionado con impresora 3D, en fragmentos de 1,5 x 1,5 cm y 1 mm de espesor.

II. ENSAYOS REALIZADOS/SOLICITADOS:

- DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD según norma UNE-EN ISO 10993-5:2009

III. RESULTADOS:

La norma UNE-EN ISO 10993-5:2009 describe el método para evaluar la citotoxicidad in vitro de productos sanitarios (u otros materiales) mediante la incubación de células cultivadas con los materiales correspondientes, bien por contacto directo o por difusión. Mediante la evaluación de determinados parámetros biológicos, se determina la respuesta de las células de mamífero expuestas a los materiales problema.

El método empleado ha sido el Contacto Directo, con un periodo de exposición de 24 h.

La línea celular empleada ha sido la HaCaT (queratinocitos humanos). Las células HaCaT se sembraron en placas Petri de 60 mm, y se cultivaron hasta el 80% de confluencia. El medio y condiciones de cultivo han sido las estándar para este tipo celular (Medio DMEM más L-glutamina, incubación a 37 °C, 5% CO₂).

**INFORME Nº:** C-16119303**ASUNTO:** Pon Asunto**SOLICITANTE:** INTERIOR**I. MUESTRAS:**

a Muestras de filamento con nanopartículas de plata añadida _____

II. ENSAYOS REALIZADOS/SOLICITADOS:

- PROYECTO: AMFAB-II (IMDECA/2016/2)
 - DETERMINACIÓN DE EFECTO ANTIBACTERIANO EN MEDIO LÍQUIDO
 - DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD según norma UNE-EN ISO 10993-5: 2009
-

III. RESULTADOS:**1. DETERMINACIÓN DE EFECTO ANTIBACTERIANO EN MEDIO LÍQUIDO****OBJETIVO**

El objetivo de este estudio es evaluar la posible actividad antimicrobiana mediante efecto del material en medio líquido, sobre 2 cepas bacterianas estándar, de filamento de PU con y sin nanopartículas de plata incorporada.

El ensayo ha sido realizado en medio líquido. Se han analizado duplicados de cada muestra.

MATERIAL UTILIZADO

Para la determinación de la actividad antimicrobiana de las muestras se ha utilizado el siguiente material:

INESCOP ELDA e-mail:inescop@inescop.es
INESCOP ELCHE e-mail:utelche@inescop.es
INESCOP BALEARES e-mail:utinca@inescop.es
INESCOP FUENSALIDA C.C. e-mail:asidcat@asidcat.com

INESCOP RIOJA e-mail:utarnedo@inescop.es
INESCOP VILLENA e-mail:utvillena@inescop.es
INESCOP VALL D'UIXÓ e-mail:utvall@inescop.es

- Cepas de trabajo:
 - o *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, (Scroter 1886) Trevisan 1887 CECT 141.
 - o *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, Rosenbach 1884 CECT 239
- Medios de cultivo NB (Nutrient Broth).
- Condiciones de crecimiento: 37 °C y 160 rpm.

Nutrient Broth (1L) pH = 7.2

Extracto de carne (5 g)
Peptona (10 g)
NaCl (5 g)

PU Control (No funcionalizado)
PU Funcionalizado con plata

A. Muestras:

A.1. Sólidas:

1.8 ml NB
200 µl de suspensión bacteriana con OD₅₄₆ de 0,1
PU cortado en trozos pequeños (menor que 4mm)

B. Controles:

B1. Control Negativo (CN): 2.0 ml NB

B.2. Controles Positivos (CP):

B.2.1. 1.7 ml NB
200 µl de suspensión bacteriana con OD₅₄₆ de 0,1
100 µl de agua desionizada autoclavada.

ENSAYOS REALIZADOS/SOLICITADOS:

– DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (Código 6852).

Determinación del efecto antimicrobiano de muestras de emulsiones de nanopartículas de plata con gelatina o borohidruro en cultivos de *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* mediante cultivos en medio líquido después de 18 - 24 horas de crecimiento.

RESULTADOS:

Para la realización del ensayo se ha evaluado el efecto de los diferentes tratamientos en cultivos de *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* tras 18 - 24 horas de crecimiento en diferentes condiciones:

Tabla con los pesos de las muestras de TPU funcionalizado y no funcionalizado. Según el fabricante el TPU esta funcionalizado con 1% de nanopartículas de Ag⁰.

| MUESTRA | mg de TPU | µg de Ag (1%) | K. pneumoniae (G-) |
|---------|-----------|---------------|--------------------|
| 1 | 105,3 | 1053 | |
| 2 | 101,7 | 1017 | |
| 3 | 49,8 | 498 | |
| 4 | 51,7 | 517 | |
| 5 | 13,5 | 135 | |
| 6 | 12,7 | 127 | |
| 7 | 108,9 | - | |
| 8 | 102,1 | - | |
| 9 | 51,4 | - | |
| 10 | 52,8 | - | |
| 11 | 13,3 | - | |
| 12 | 16,3 | - | |
| | | | |
| MUESTRA | mg de TPU | µg de Ag (1%) | S. aureus (G+) |
| 1 | 105,2 | 1052 | |
| 2 | 103,7 | 1037 | |
| 3 | 59,4 | 594 | |
| 4 | 52,9 | 529 | |
| 5 | 11,8 | 118 | |
| 6 | 13,5 | 135 | |
| 7 | 101,6 | - | |
| 8 | 102,0 | - | |
| 9 | 50,1 | - | |
| 10 | 51,6 | - | |
| 11 | 10,5 | - | |
| 12 | 11,6 | - | |
| 13 | 207,7 | 2077 | |
| 14 | 204,5 | 2045 | |

Para ello se han realizado cultivos de 1,8 ml de NB en los cuales se ha inoculado 0.2 ml de cada cepa a una densidad óptica inicial de 0.1 (OD_{546nm}) y se ha evaluado para cada una de ellas las condiciones anteriormente descritas a 18 - 24 horas. El efecto antimicrobiano ha sido establecido mediante medida visual de la turbidez del cultivo. El crecimiento bacteriano se indica como "+" y la ausencia de crecimiento como "-". El símbolo "+/-" indica una muestra con crecimiento, pero inferior al control positivo (bacteria + medio de cultivo).

Comentarios:

El producto funcionalizado Poliuretano termofusible (Ref. "MUESTRA FUNCIONALIZADA"), extrusionada con impresora 3D, cortado en fragmentos y 1 mm de espesor. **NO presenta actividad antibacteriana** para ninguna de las bacterias testadas.

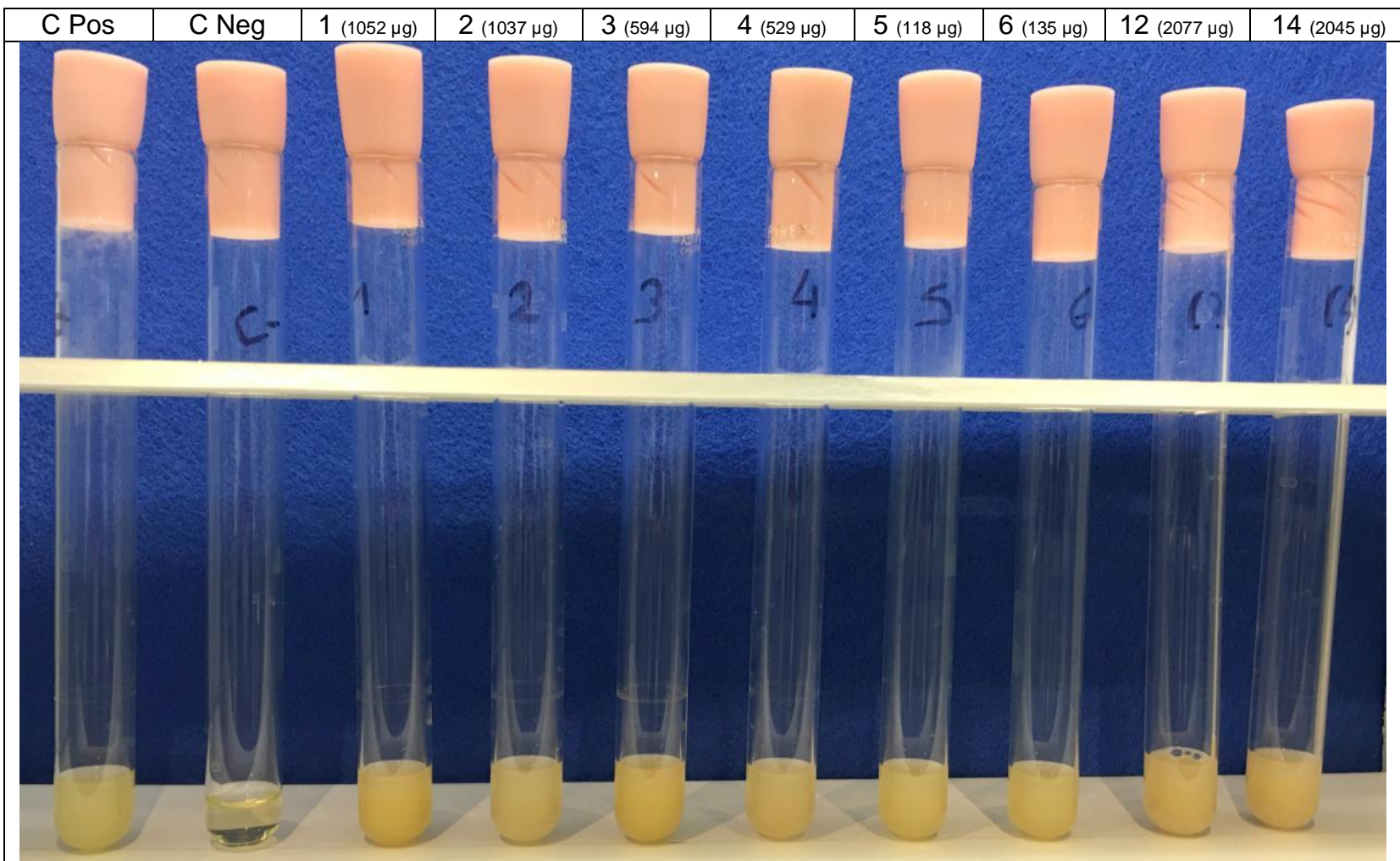


Figura 1. Muestras evaluadas en medio líquido de *Staphylococcus aureus* CECT 239 con diferentes pesos de TPU impregnados con nanoparticulas de Ag (de 1 a 6 – Funcionalizado).

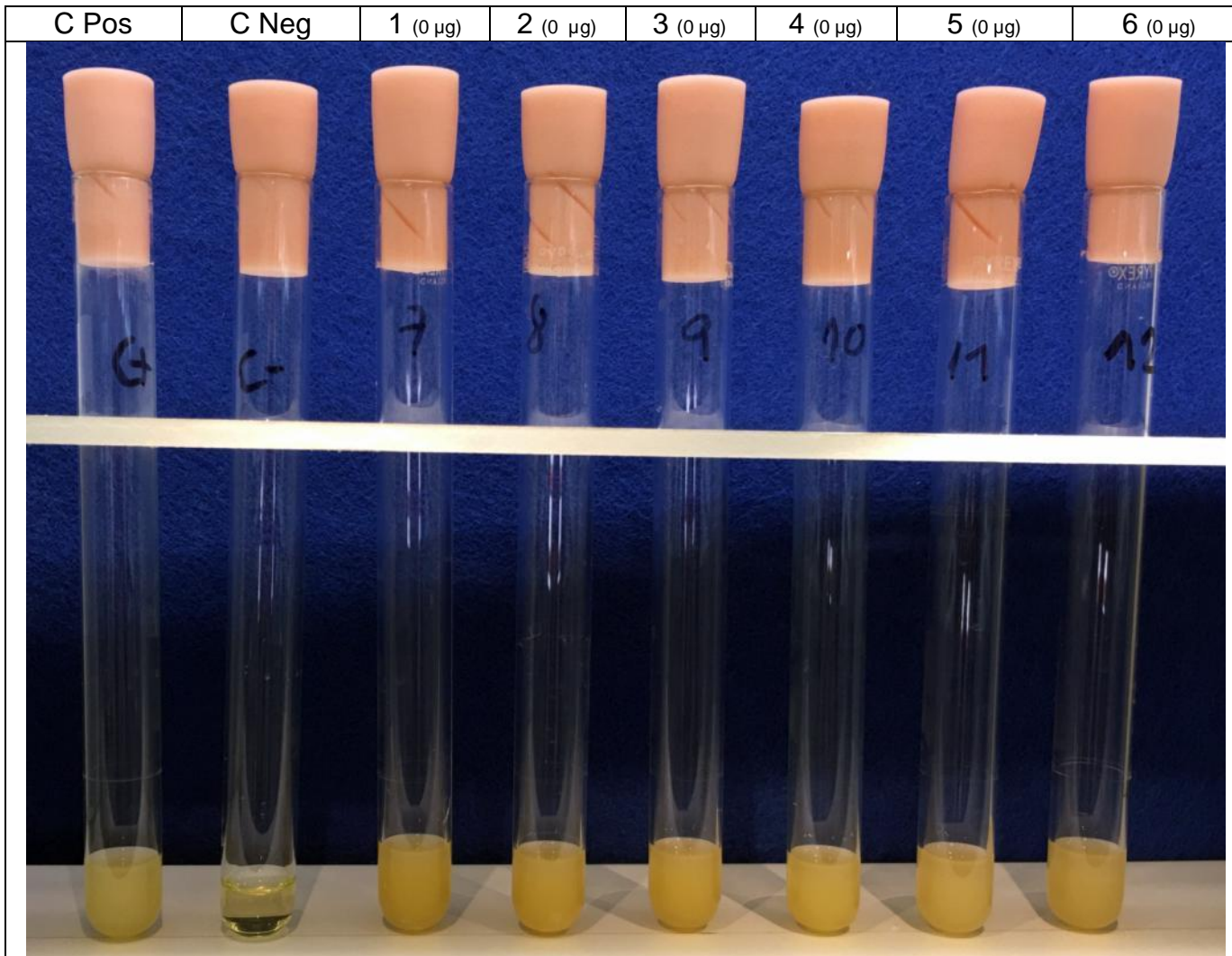


Figura 2. Muestras evaluadas en medio líquido de *Staphylococcus aureus* CECT 239 con diferentes pesos de TPU sin nanopartículas de Ag (de 7 a 12 - NO Funcionalizados)

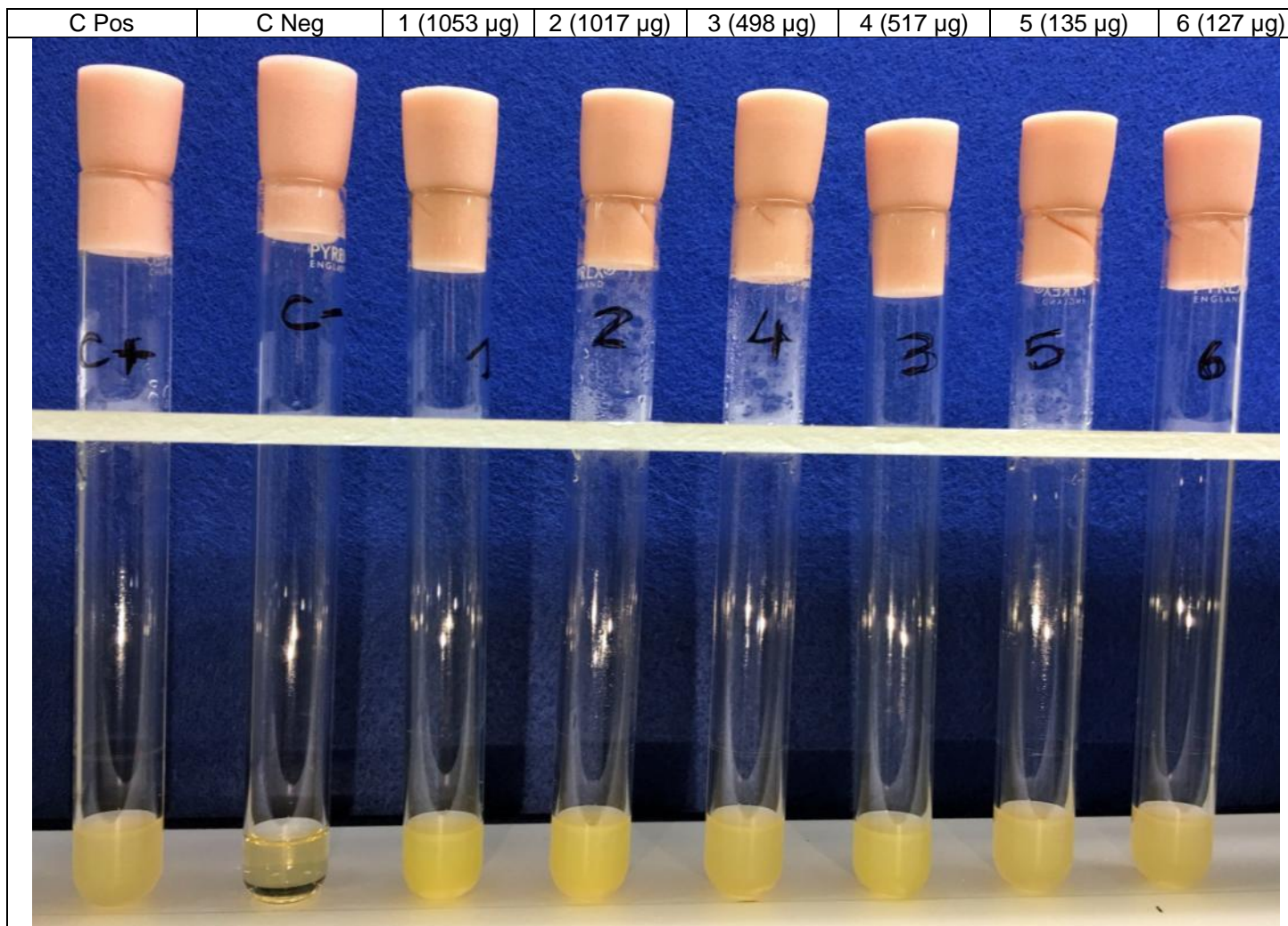


Figura 3. Muestras evaluadas en medio líquido de *Klebsiella pneumoniae* CECT141 con diferentes pesos de TPU impregnados con nanoparticulas de Ag (de 1 a 6 - Funcionalizado)

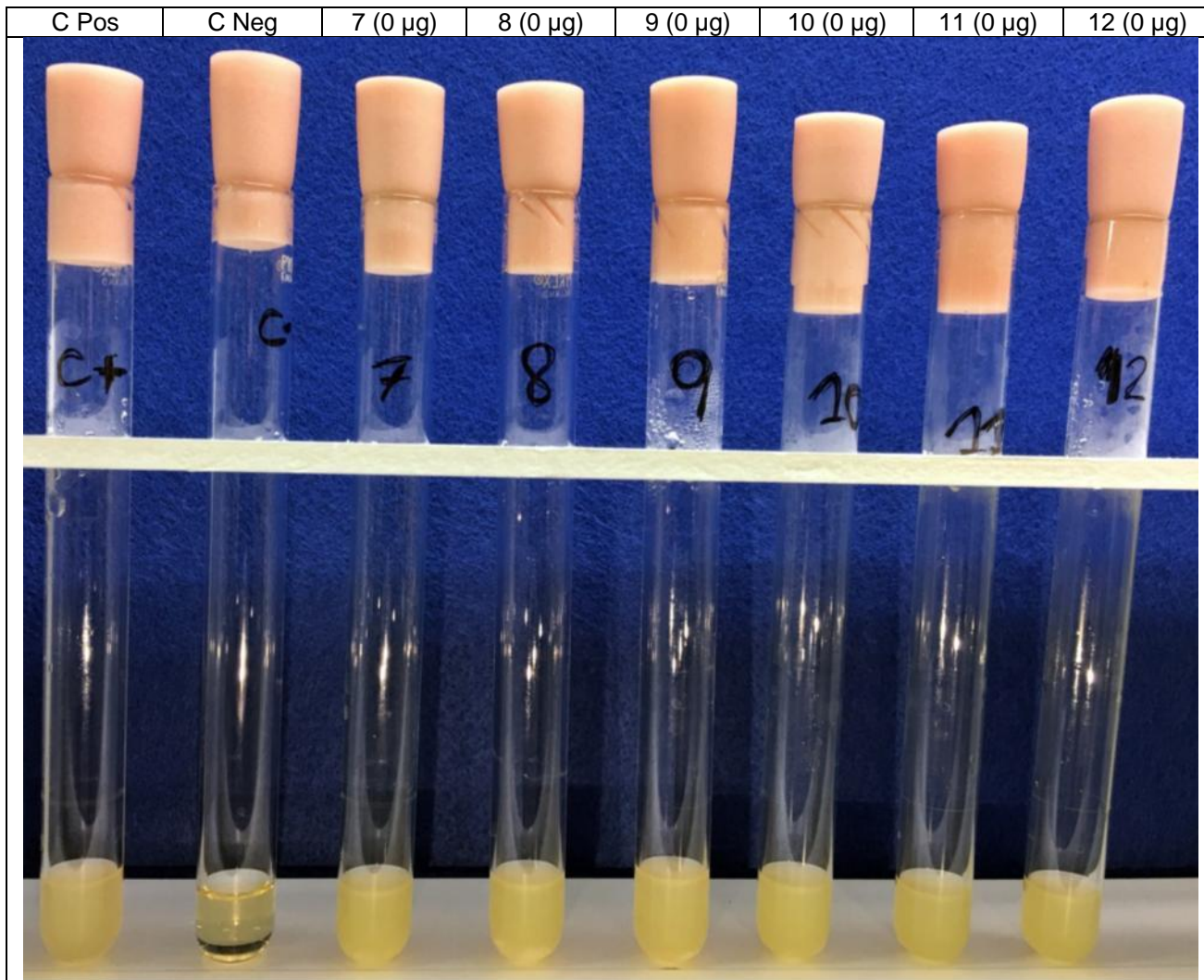


Figura 4. Muestras evaluadas en medio líquido de *Klebsiella pneumoniae* CECT141 con diferentes pesos de TPU sin nanopartículas de Ag (de 7 a 12 - NO Funcionalizados)

2. DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD

- Muestra analizada: Poliuretano termofusible (Ref. "MUESTRA FUNCIONALIZADA"), extrusionada con impresora 3D, en fragmentos de 1,5 x 1,5 cm y 1 mm de espesor. La muestra no funcionalizada fue evaluada previamente en el informe C-16098768, no habiendo resultado citotóxica.

La norma UNE-EN ISO 10993-5:2009 describe el método para evaluar la citotoxicidad in vitro de productos sanitarios (u otros materiales) mediante la incubación de células cultivadas con los materiales correspondientes, bien por contacto directo o por difusión. Mediante la evaluación de determinados parámetros biológicos, se determina la respuesta de las células de mamífero expuestas a los materiales problema.

El método empleado ha sido el Contacto Directo, con un periodo de exposición de 24 h.

La línea celular empleada ha sido la HaCaT (queratinocitos humanos). Las células HaCaT se sembraron en placas Petri de 60 mm, y se cultivaron hasta el 80% de confluencia. El medio y condiciones de cultivo han sido las estándar para este tipo celular (Medio DMEM más L-glutamina, incubación a 37 °C, 5% CO₂).

Para llevar a cabo el ensayo, el medio fue eliminado, y se añadió medio fresco. Cada muestra fue situada cuidadosamente en el centro de la placa Petri correspondiente. Las células se cultivaron durante 24h en presencia de las muestras, y la citotoxicidad fue evaluada de modo cualitativo. Se emplearon triplicados de cada muestra, además de una muestra control (sólo medio de cultivo).

Las muestras fueron previamente esterilizadas mediante gradientes de etanol, para evitar la contaminación de las células durante la exposición a las mismas. El tamaño de las muestras corresponde a aproximadamente 1/10 de la superficie de cultivo, tal y como indica la norma.

- Evaluación cualitativa de la citotoxicidad:

Para la evaluación cualitativa, las muestras fueron retiradas, y los cultivos celulares fueron examinados mediante un microscopio invertido. Se evaluaron aspectos como cambios morfológicos, vacuolización, despegue celular, lisis, integridad de las membranas y estado del núcleo. El estado de las muestras fue graduado conforme a los siguientes grados de reactividad, de acuerdo a la norma empleada:

Tabla 1. Grados de reactividad para el ensayo de contacto directo.

| Grado | Reactividad | Descripción de la zona reactiva |
|-------|-------------|---|
| 0 | Ninguna | No se detectan células alteradas ni debajo ni alrededor de la muestra |
| 1 | Ligera | Algunas células deformadas o degeneradas bajo la muestra |
| 2 | Media | Zona limitada al área bajo la muestra |
| 3 | Moderada | Zona que se extiende hasta 1,0 cm desde la muestra |
| 4 | Severa | Zona que se extiende más de 1,0 cm más allá de la muestra |

Como indica la tabla 1, la evaluación fue realizada asignando valores al efecto del material ensayado sobre el cultivo celular, que abarcaron un rango desde “0” (sin efecto observable) hasta 4 (daño severo). Se considera citotóxica una muestra que alcance un valor mayor de 2.

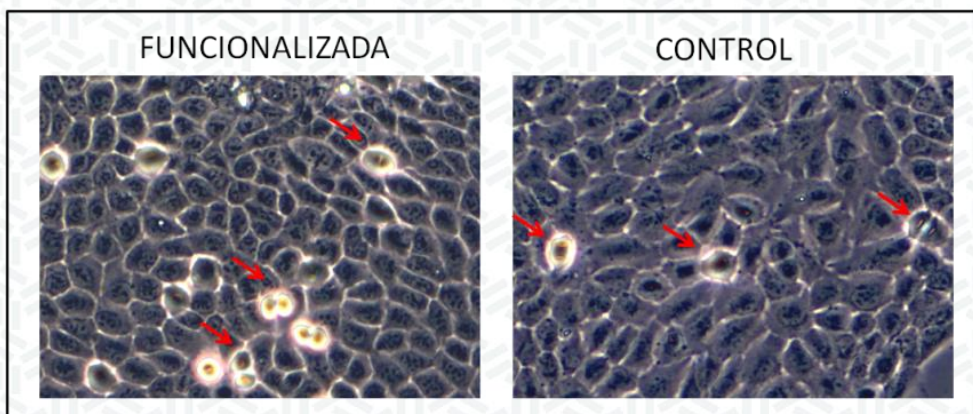


Figura 5. Microfotografías representativas de cultivos celulares expuestos al material de ensayo. Las flechas rojas indican células en proceso de división.

La tabla siguiente recoge los resultados obtenidos (Tabla 2):

| MUESTRA | GRADUACIÓN EFECTO |
|-------------------------|-------------------|
| Control | 0 |
| Material funcionalizado | 1 |

CONCLUSIONES:

La muestra evaluada presenta un grado de reactividad de 1, observándose algunas células deformadas bajo la muestra. El resto de superficie de cultivo muestra células completamente sanas, observándose numerosas células en proceso de división. Se concluye que la muestra evaluada no es citotóxica.

IV. CONDICIONES AMBIENTALES:

Excepto cuando se especifican otras condiciones, los ensayos que figuran en el presente informe se han realizado en las condiciones ambientales siguientes:

| | |
|-------------------|--------|
| Temperatura: | 23±2°C |
| Humedad relativa: | 50±5% |

Elda, 29 noviembre 2016.

Fdo.: Marcelo Bertazzo
Dr. Biología

Sigue hoja con prescripciones.

V. PRESCRIPCIONES:

- 1** INESCOP responde únicamente de los resultados consignados en el informe que se refiere exclusivamente a los materiales o muestras que se indican en el mismo y que queden en su poder. Salvo mención expresa, las muestras han sido libremente elegidas y enviadas por el solicitante.
- 2** Ninguna de las indicaciones formuladas en este informe puede tener el carácter de garantía para las marcas comerciales que en su caso se citen.
- 3** Generalmente, y salvo indicación expresa, los materiales de ensayo se conservarán seis meses después de su utilización y, tras este plazo, no se podrán realizar comprobaciones.
- 4** Los resultados se consideran como propiedad del solicitante y, sin autorización previa, INESCOP se abstendrá de comunicarlos a un tercero. Sin embargo, pasado un mes de la entrega del informe, INESCOP podrá publicar los resultados con fines estadísticos o científicos.
- 5** Las incertidumbres estimadas de los ensayos acreditados por ENAC se encuentran a disposición del cliente en INESCOP.
- 6** Este Instituto no se hace responsable en ningún caso, de la interpretación o uso indebido que pueda hacerse de este documento, cuya reproducción total o parcial, con fines de publicidad y sin la autorización de INESCOP, esta totalmente prohibida.
- 7** Ante posibles discrepancias entre informes, se procedería a una comprobación dirimente en la Sede Central de este Instituto.
- 8** En el supuesto de que se pretenda utilizar el presente informe como prueba pericial ante cualquier órgano judicial, se requerirá inexcusablemente la aceptación y conformidad previa expresa de INESCOP. A los efectos indicados los Técnicos de INESCOP que elaboren el informe no podrán ser citados en calidad de Testigos en el procedimiento judicial en que sea utilizado pericialmente dicho informe. La aceptación del cargo de perito requerirá el abono previo en las cuentas de INESCOP de la provisión de fondos correspondiente, por la parte o partes que hubiesen propuesto la prueba pericial.

Este Instituto está autorizado por la Dirección General de Información e Inspección Comercial del Ministerio de Comercio, para que sus dictámenes analíticos ostenten validez legal, a efectos de cuanto preceptúa el Real Decreto 1945/1983, de 22 de junio (BOE 15.07.83) sobre análisis de calzados, sus materias primas, cualidades de fabricación, etc.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 |
| ENSAYO | -1 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | -2 | 20 | 21 | 22 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 |

DETERMINACION DE EFECTO ANTIBACTERIA NO EN MEDIO LIQUIDO

VI. CONDICIONES AMBIENTALES:

Excepto cuando se especifican otras condiciones, los ensayos que figuran en el presente informe se han realizado en las condiciones ambientales siguientes:

| | |
|-------------------|--------|
| Temperatura: | 23±2°C |
| Humedad relativa: | 50±5% |

Elda, 4 noviembre 2016

Fdo.: Marcelo Bertazzo
Dr. Biología

Puede consultar las prescripciones del laboratorio en la dirección
<http://www.inescop.es/prescripcioneslaboratorio>

Para llevar a cabo el ensayo, el medio fue eliminado, y se añadió medio fresco. Cada muestra fue situada cuidadosamente en el centro de la placa Petri correspondiente. Las células se cultivaron durante 24h en presencia de las muestras, y la citotoxicidad fue evaluada de modo cualitativo. Se emplearon triplicados de cada muestra, además de una muestra control (sólo medio de cultivo).

Las muestras fueron previamente esterilizadas mediante gradientes de etanol, para evitar la contaminación de las células durante la exposición a las mismas. El tamaño de las muestras corresponde a aproximadamente 1/10 de la superficie de cultivo, tal y como indica la norma.

- Evaluación cualitativa de la citotoxicidad:

Para la evaluación cualitativa, las muestras fueron retiradas, y los cultivos celulares fueron examinados mediante un microscopio invertido. Se evaluaron aspectos como cambios morfológicos, vacuolización, despegue celular, lisis, integridad de las membranas y estado del núcleo. Además, los cultivos fueron teñidos con dos colorantes fluorescentes: SYTO9, que marca todas las células en verde, permitiendo distinguir sus detalles, y el colorante fluorescente PI (yoduro de propidio), que marca las células muertas o dañadas en rojo (Figura 2).

El estado de las muestras fue graduado conforme a los siguientes grados de reactividad, de acuerdo a la norma empleada:

Tabla 1. Grados de reactividad para el ensayo de contacto directo.

| Grado | Reactividad | Descripción de la zona reactiva |
|-------|-------------|---|
| 0 | Ninguna | No se detectan células alteradas ni debajo ni alrededor de la muestra |
| 1 | Ligera | Algunas células deformadas o degeneradas bajo la muestra |
| 2 | Media | Zona limitada al área bajo la muestra |
| 3 | Moderada | Zona que se extiende hasta 1,0 cm desde la muestra |
| 4 | Severa | Zona que se extiende más de 1,0 cm más allá de la muestra |

Como indica la tabla 1, la evaluación fue realizada asignando valores al efecto del material ensayado sobre el cultivo celular, que abarcaron un rango desde "0" (sin efecto observable) hasta 4 (daño severo). Se considera citotóxica una muestra que alcance un valor mayor de 2.

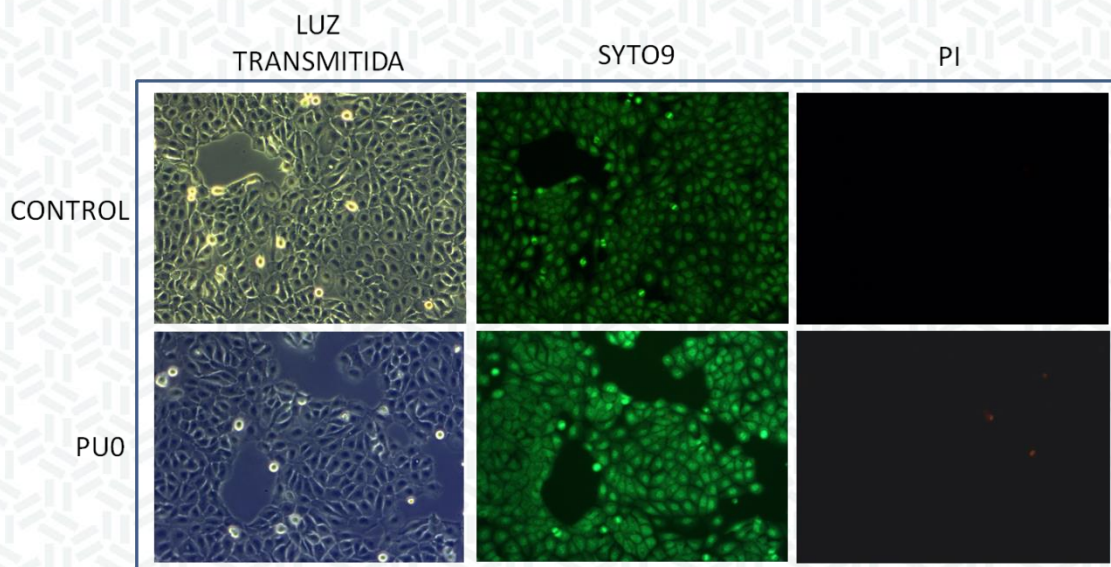


Figura 1. Microfotografías representativas de cultivos celulares expuestos al material de ensayo y teñidos con colorantes fluorescentes.

La tabla siguiente recoge los resultados obtenidos (Tabla 2):

| MUESTRA | GRADUACIÓN EFECTO |
|---------|-------------------|
| Control | 0 |
| PU0 | 1 |

IV. CONCLUSIONES:

La muestra evaluada presenta un grado de reactividad de 1 (algunas células deformadas bajo la muestra), considerándose por tanto que no es citotóxica. La tinción fluorescente confirma esta observación.

V. CONDICIONES AMBIENTALES:

Excepto cuando se especifican otras condiciones, los ensayos que figuran en el presente informe se han realizado en las condiciones ambientales siguientes:

| | |
|-------------------|--------|
| Temperatura: | 23±2°C |
| Humedad relativa: | 50±5% |

Elda, 28 septiembre 2016

Fdo.: María Isabel Maestre López
Dra. Biología

Puede consultar las prescripciones del laboratorio en la dirección
<http://www.inescop.es/prescripcioneslaboratorio>