

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ  
ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN INGENIERÍA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES



“DESARROLLO DE MATRICES POROSAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA) Y  
POLIETILENGLICOL (PEG) MEDIANTE IMPRESIÓN 3D, ADITIVADAS  
CON QUITOSANO Y ÁCIDO ÚSNICO PARA  
EVALUAR SU LIBERACIÓN CONTROLADA”

**Tesis para optar el grado académico de:**  
Magíster en Ingeniería y Ciencia de los Materiales

**Presentado por:**

José Jhonatan Quijano Rentería

**Asesor:**

Dr. Ing. Julio A. Acosta Sullcahuamán

**Jurados:**

Dr. Francisco A. Rumiche Zapata

Dr. Ing. Julio A. Acosta Sullcahuamán

Dr. Paul P. Lean Sifuentes

**Lima – Perú**

**2017**

## RESUMEN

Uno de los propósitos de la Ingeniería de Tejidos es reemplazar tanto a órganos como tejidos en el cuerpo con materiales compatibles con el mismo. Destaca el uso de algunos materiales poliméricos, biodegradables y biocompatibles, en el desarrollo de dispositivos que puedan transportar fármacos, regenerar tejidos, sustituir funciones así como ofrecer aplicaciones y soluciones para problemas más personalizados. Las matrices porosas poliméricas (*Scaffolds*) son sistemas de andamiaje temporales, que buscan mejorar y poder dar tratamientos de regeneración más personalizados y de menor rechazo que otros métodos convencionales. Entre los polímeros más utilizados en este campo de la ciencia se tiene el ácido poliláctico (PLA), que es un termoplástico con propiedades adecuadas de biocompatibilidad y biodegradación, de fácil procesamiento y modificación; otro polímero muy usado es el polietilenglicol (PEG), debido a su afinidad biológica, a la proliferación de células y la no degradación y degeneración de proteínas en presencia de este polímero.

El objetivo de este trabajo es desarrollar matrices porosas (*scaffolds*) fabricadas a partir de materiales compuestos de ácido poliláctico (PLA) y polietilenglicol (PEG) mediante la técnica de modelado por deposición fundida empleada en la impresión 3D, para luego aditivarlo con ácido úsnico y quitosano y, por último, evaluar su liberación controlada en un medio determinado.

La metodología experimental utilizada para este fin fue la siguiente: inicialmente se fabricaron filamentos de materiales compuestos de PLA/PEG con 0%, 5% y 10% de PEG en peso, en una extrusora de doble husillo; luego se obtuvieron las matrices porosas mediante impresión 3D con diferentes parámetros y porcentajes de relleno; seguidamente se realizó la aditivación del ácido úsnico en las matrices porosas; asimismo, se recubrieron éstas con una película de quitosano, sumergiendo la matriz polimérica en una solución al 1% de quitosano en ácido acético diluido, para luego evaluar la liberación del fármaco en una solución tampón salina (*buffer*); los ensayos realizados para la caracterización de las propiedades de las matrices poliméricas fueron: espectro infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), termogravimetría (TGA), microscopía óptica (SEM) y degradación en un medio acuoso; siguiendo en la mayoría las recomendaciones y procedimientos propuestos en las normas ASTM y trabajos de referencia anteriores a los mismos.

Como resultado, se obtuvieron las curvas de liberación controlada del fármaco en una solución tampón salina en función del tiempo, determinándose que la liberación del fármaco para porcentajes de relleno de 50% y 80% aumenta a mayores porcentajes de PEG, al mismo tiempo que se evidencia una menor velocidad de liberación en presencia de la película de quitosano.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecer en primer lugar, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por darme la oportunidad a mí y a muchos jóvenes estudiantes lograr complementar nuestro desarrollo en el ámbito profesional, académico y personal con los estudios de maestría. Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) y a la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP) por firmar el convenio PUCP-FONDECYT 012-2015 el cual hizo posible el financiamiento de mis estudios y su adecuada finalización.

A mi asesor y amigo, el Dr. Julio Arnaldo Acosta Sulcahuamán, por su tiempo, dedicación, paciencia, consejo y apoyo en el desarrollo de la presente tesis; así como también en las enseñanzas dentro y fuera del aula, siempre muy amable, dedicado y preocupado por nuestra formación.

Al personal del centro de investigación tecnológica (CITE) de la facultad Ingeniería Mecánica de la PUCP (CITE), en especial a la Mg. Maricarmen Mejía Chueca, por su apoyo y colaboración de manera amable y generosa en los diferentes requerimientos que conllevó la culminación del presente trabajo.

Al personal de la Sala de Manufactura Digital VEO, a Jennifer Wong, a la Ing. Diana Rocío Zapata Del Mar, a la Ing. Midori Sánchez Sifuentes, por sus apoyos constantes durante la estancia en el uso de la impresora en su laboratorio, el interés y compromiso mostrado para el desarrollo del presente trabajo proporcionando facilidades en el uso de los equipos, espacios y tiempo.

A mis amigos en el laboratorio 4, por los buenos momentos y consejos siempre vividos ahí, su compañerismo y su siempre disposición ante cualquier necesidad, consejo y ayuda, a Adán, Daniel, Kelly, Andoni, Roger, Alirio, Sol, Luz, Diego, Luis y tantas personas que quizá no mencione, muchas gracias.

A mi grupo de compañeros de la maestría, a cada profesor, a cada persona que me ayudo y estuvo en estos años en la universidad, por el apoyo constante y el haber hecho de este camino, un camino de muchos buenos recuerdos y grandes amistades.

Muchas Gracias

## DEDICATORIA

*A Mamá, su voluntad y ejemplo, a sus manos y su vida.*

*A Papá, su corazón de niño, mi gran y mejor amigo.*

*A Katy y su actitud con la vida, mi alegría y mi ejemplo.*

*Al frío y la lluvia en Huaraz.*

## INDICE

|  |     |
|--|-----|
| RESUMEN.....   | i   |
| AGRADECIMIENTOS.....   | ii  |
| DEDICATORIA.....   | iii |
| INDICE.....  | iv  |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS.....  | x   |
| INTRODUCCIÓN.....  | 1   |
| CAPÍTULO I.....  | 5   |
| FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....                                      | 5   |
| 1.1. Ingeniería biomédica e ingeniería de tejidos.....         | 6   |
| 1.1.1 Las matrices poliméricas porosas (scaffolds).....        | 7   |
| 1.1.2. Partes de una matriz polimérica porosa.....             | 8   |
| 1.1.3. Propiedades de los matrices poliméricas porosas.....    | 9   |
| 1.1.4. Métodos de obtención.....                               | 10  |
| 1.2. Impresión 3D.....   | 13  |
| 1.2.1. Métodos de impresión.....                               | 14  |
| 1.3. Materiales poliméricos para la ingeniería de tejidos..... | 21  |
| 1.3.1. Ácido poliláctico.....                                  | 24  |
| 1.3.2. Polietilenglicol (PEG).....                             | 25  |
| 1.3.3. Quitosano.....  | 26  |
| 1.4. Liberación controlada de fármacos.....                    | 28  |
| 1.4.1. La ley de BOUGUER-LAMBERT-BEER.....                     | 30  |
| 1.4.2. Ácido Úsnico.....                                       | 31  |
| CAPÍTULO II.....   | 33  |
| METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....                                  | 33  |
| 2.1. Descripción de los equipos.....                           | 34  |
| 2.1.1. Extrusora de doble husillo VICCO S.A.....               | 34  |
| 2.1.2. Horno de convección.....                                | 35  |
| 2.1.3. Plancha de calentamiento con agitación.....             | 36  |
| 2.1.4. Balanza analítica METTER TOLEDO.....                    | 37  |
| 2.1.5. Impresora Makerbot Replicator 2X.....                   | 38  |
| 2.2 Descripción de los materiales.....                         | 38  |

|                            |   |    |
|----------------------------|---|----|
| 2.2.1                      | Ácido poliláctico.....                                    | 38 |
| 2.2.2                      | Polietilenglicol (PEG).....                               | 39 |
| 2.2.3.                     | Quitosano.....  | 40 |
| 2.2.4.                     | Reactivos.....  | 41 |
| 2.3.                       | Ensayos de caracterización.....                           | 42 |
| 2.3.1.                     | Índice de fluidez.....                                    | 42 |
| 2.3.2.                     | Espectro infrarrojo de transformada de Fourier FTIR.....  | 42 |
| 2.3.3.                     | Análisis termogravimétrico TGA.....                       | 43 |
| 2.3.4.                     | Calorimetría de barrido diferencial DSC.....              | 44 |
| 2.3.5.                     | Microscopía electrónica de barrido.....                   | 45 |
| 2.3.6.                     | Degradación hidrolítica / mineralización.....             | 46 |
| 2.3.7.                     | Degradación hidrolítica acelerada.....                    | 46 |
| 2.3.8.                     | Porosidad.....  | 46 |
| 2.3.9.                     | Microscopía UV visible.....                               | 47 |
| 2.4.                       | Procedimiento experimental.....                           | 48 |
| 2.4.1.                     | Obtención de filamentos.....                              | 48 |
| 2.4.2.                     | Obtención de matrices porosas.....                        | 51 |
| 2.4.2.                     | Degradación hidrolítica.....                              | 52 |
| 2.4.3.                     | Degradación hidrolítica acelerada.....                    | 55 |
| 2.4.4.                     | Aditivación de la matriz polimérica con ácido úsnico..... | 55 |
| 2.4.5.                     | Ensayos de liberación controlada.....                     | 57 |
| CAPÍTULO III.....          |   | 59 |
| RESULTADOS Y ANÁLISIS..... |   | 59 |
| 3.1.                       | Caracterización de los filamentos y aditivos.....         | 60 |
| 3.1.1.                     | Ensayos de fluidez.....                                   | 60 |
| 3.1.2.                     | Ensayos de FTIR del PLA y PEG.....                        | 61 |
| 3.1.3.                     | Ensayos TGA.....  | 62 |
| 3.1.4.                     | Ensayos de DSC.....                                       | 65 |
| 3.1.5                      | Espectro FITR del quitosano.....                          | 68 |
| 3.1.6.                     | Espectro FTIR del ácido úsnico.....                       | 69 |
| 3.1.7.                     | Ensayo de Porosidad.....                                  | 70 |
| 3.2.                       | Ensayos de degradación de las matrices porosas.....       | 73 |
| 3.2.1.                     | Ensayo de degradación hidrolítica.....                    | 73 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.2. Ensayo de degradación acelerada ..... | 78 |
| 3.3. Liberación controlada .....             | 80 |
| 3.3.1. Curvas de liberación .....            | 80 |
| CONCLUSIONES .....                           | 92 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....             | 94 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.1. Visión y desarrollo a futuro de la aplicación de la ingeniería de tejidos. ....  | 7  |
| Figura 1.2. Micrografía SEM de material poroso de PLLA/PLGA preparado mediante la técnica de separación de fases [20].....   | 11 |
| Figura 1.3. Imagen liofilizada de un scaffold quitosano/colágeno. A la derecha su micrografía SEM notándose los poros en la misma [28].....  | 12 |
| Figura 1.4. Síntesis polimérica de la policaprolactona con polietilenglicol [29]. ....   | 13 |
| Figura 1.5. Proceso para la obtención de una matriz polimérica para un determinado caso. <b>a.</b> Identificación del problema corporal. <b>b.</b> Modelado computacional. <b>c.</b> Diseño en programa STL. <b>d.</b> Obtención de la pieza impresa. <b>e.</b> Caracterización mediante imágenes SEM. <b>f.</b> implantación en el organismo vivo. <b>g.</b> Evaluación en la regeneración del tejido[31]. .... | 15 |
| Figura 1.6. Esquema de las configuraciones del método de SLA [28]. ....  | 17 |
| Figura 1.7. Disposición esquemática de la impresión por chorro de tinta.....   | 18 |
| Figura 1.8. Esquema del proceso de impresión por FDM [40] .....  | 20 |
| Figura 1.9. Defectos superficiales de la impresión 3D, efecto de la escalera [39].....   | 20 |
| Figura 1.10. Clasificación de los polímeros biodegradables [42]. ....  | 22 |
| Figura 1.11. Proceso para la obtención actual de PLA [47]......  | 25 |
| Figura 1.12. Estructura química del PEG [37] .....   | 25 |
| Figura 1.13. Estructura de la quitina, quitosano y quitano [59]. ....  | 27 |
| Figura 1.14. Estructura de los enantiómeros ácido (-) úsnico del ácido (+) -úsnico. El centro estereogénico se muestra en la posición 9b [57]. ....  | 32 |
| <br>   |    |
| Figura 2.1. <b>a.</b> Extrusora de doble husillo; <b>b.</b> Bomba de vacío; <b>c.</b> Plato rompedor.....  | 35 |
| Figura 2.2. Horno de convección del laboratorio 4 .....  | 36 |
| Figura 2.3. Plancha de calentamiento .....   | 37 |
| Figura 2.4. Balanza analítica Metter Toledo .....  | 37 |
| Figura 2.5. Impresora 3D MakerBot Replicator 2x.....   | 38 |
| Figura 2.6. Polietilenglicol utilizado para la obtención de nuestras matrices poliméricas...   | 40 |
| Figura 2.7. Quitosano proporcionado en la PUCP para la funcionalización de la matriz polimérica .....  | 41 |



|  |    |
|--|----|
| Figura 2.8. Equipo MFI laboratorio 4 de mecánica.....  | 42 |
| Figura 2.9. Equipo FTIR del laboratorio CITE de la PUCP .....  | 43 |
| Figura 2.10. Equipo TGA NETZSCH STA 449 F1 Júpiter®del CITE. ....  | 44 |
| Figura 2. 11 <b>a.</b> Equipo DSC NETZSCH STA 449 F1 Júpiter®. <b>b.</b> Programa de temperatura usado para la determinación de resultados en el DSC.....  | 44 |
| Figura 2.12. <b>a.</b> Equipo SEM FEI Quanta 650 del laboratorio de investigación de la PUCP. <b>b.</b> Obtención de las imágenes mostrando el proceso de las mismas.....                                      | 45 |
| Figura 2.13. Esquema para la determinación de la porosidad experimental de las matrices porosas. ....  | 46 |
| Figura 2.14. Espectrofotómetro Lambda de doble haz de luz.....   | 47 |
| Figura 2.15. Funcionamiento del equipo UV donde los dos haces de luz miden tanto la luz directa como la luz absorbida por el material.....   | 48 |
| Figura 2. 16. Mezclado de pellets de PLA y PEG.....  | 49 |
| Figura 2. 17. Obtención de filamentos mostrando la sección transversal del mismo. ....   | 49 |
| Figura 2.18. Disposición geométrica en el proceso de impresión, dándose esta repetición capa por capa .....  | 51 |
| Figura 2.19. Proceso de impresión de Matrices poliméricas porosas en la impresora MakerBoot 2X.....  | 52 |
| Figura 2.20. Ensayos de degradación en fluido corporal simulado (SBF).....   | 54 |
| Figura 2.21. Funcionalización del armazón polimérico (Scaffold) con el ácido úsnico (AU) .....   | 56 |
| Figura 2.22. <b>a.</b> PBS agitando con el scaffold mientras se va liberando el fármaco; <b>b.</b> Separación del fármaco de la fase acuosa con cloroformo; <b>c.</b> Muestras preparadas para lectura UV..... | 58 |
| Figura 3.1. FTIR del PLA y PEG indicando las señales características de ambos .....  | 61 |
| Figura 3.2. Estructura química de PLA y PEG según sus grupos funcionales.....  | 62 |
| Figura 3.3. <b>a.</b> Gráficas TGA, donde en la gráfica inferior <b>b.</b> se hace un acercamiento a la zona de degradación o pérdida de peso .....  | 64 |
| Figura 3.5. Gráficas DSC de las diferentes matrices poliméricas de PLA. PLA/PEG 5% y PLA/PEG 10%.....  | 66 |
| Figura 3.6. Estructura química del quitosano .....   | 68 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 3.7. Espectro FTIR del quitosano.....   | 69 |
| Figura 3.8. Espectro FTIR del ácido úsnico .....   | 70 |
| Figura 3.9. Mecanismo de degradación del ácido poliláctico en un medio acuoso, similar al fluido corporal simulado [72] .....                        | 75 |
| Figura 3.10. Variación en peso de PLA en 2 meses de sumergidas en SBF a $37 \pm 2$ °C.....   | 76 |
| Figura 3.11. Variación en peso de PLA/PEG 5% en 2 meses de sumergidas en SBF a $37 \pm 2$ °C.....  | 77 |
| Figura 3.12. Variación en peso de PLA/PEG 10% en 2 meses de sumergidas en SBF a $37 \pm 2$ °C.....   | 77 |
| Figura 3.13. Imágenes SEM del scaffold de PLA con diferentes porcentajes de PEG al 70% de infill luego de 2 meses de estar sumergido en SBF.....     | 78 |
| Figura 3.14. Degradación acelerada de PLA en NaOH 0.1N.....  | 79 |
| Figura 3.15. Degradación acelerada de PLA/PEG 5% en NaOH 0.1N.....   | 79 |
| Figura 3.16. Degradación acelerada de PLA/PEG 10% con diferente porcentaje de infill, en solución de NaOH 0.1 M a $37 \pm 2$ °C.....                 | 80 |
| Figura 3.17. Curva de determinación del rango lineal donde se cumple la ley de Beer para el AU. ....   | 82 |
| Figura 3.18. Curvas de liberación controlada para PLA en 10 horas en PBS .....   | 83 |
| Figura 3.19. Curvas de liberación controlada para PLA/PEG 5% en 10 horas en PBS.....   | 84 |
| Figura 3.20. Curvas de liberación controlada para PLA/PEG 10% en 10 horas en PBS.....  | 84 |
| Figura 3.21. Comparación entre el porcentaje de liberación de fármaco en relación con el infill o relleno para el PLA, PLA/PEG 5% y PLA/PEG 10%..... | 87 |
| Figura 3.22. Comparación entre la liberación controlada de fármaco para el PLA con 50% y 80% de infill con y sin quitosano. ....                     | 89 |
| Figura 3.23. Comparación entre la liberación controlada de fármaco para el PLA/PEG 5% con 50% y 80% de infill con y sin quitosano. ....              | 90 |
| Figura 3.24. Comparación entre la liberación controlada de fármaco para el PLA/PEG 10% con 50% y 80% de infill con y sin quitosano. ....             | 91 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1. 1.</b> Comparación entre materiales poliméricos y metálicos usados en prótesis [15]                 | 8  |
| <b>Tabla 1.2.</b> Clasificación de los principales métodos de impresión [31].                                   | 16 |
| <b>Tabla 1.3.</b> Algunos estudios sobre liberación controlada de fármacos                                      | 29 |
| <b>Tabla 2.1.</b> Propiedades físicas y químicas del ácido poliláctico.   | 39 |
| <b>Tabla 2.2.</b> Propiedades del PEG   | 40 |
| <b>Tabla 2.3.</b> Reactivos usados para la parte experimental de la tesis                                       | 41 |
| <b>Tabla 2.4.</b> Parámetros de la extrusora.   | 50 |
| <b>Tabla 2.5.</b> Filamentos obtenidos de PLA/PEG con diferentes porcentajes                                    | 50 |
| <b>Tabla 2.6.</b> Parámetros de impresión   | 51 |
| <b>Tabla 2.7.</b> Composición química del fluido corporal   | 52 |
| <b>Tabla 2.8.</b> Reactivos usados en la preparación de SBF.  | 53 |
| <b>Tabla 2.9.</b> Pesos experimentales para la obtención de SBF   | 54 |
| <b>Tabla 2.10.</b> Pesos teóricos y experimentales de la aditivación de ácido úsnico a las matrices poliméricas | 56 |
| <b>Tabla 2.11.</b> Pesos experimentales de los reactivos para la preparación de PBS                             | 57 |
| <b>Tabla 3.1.</b> Resumen de los valores obtenidos de índice de fluidez de las matrices poliméricas porosas.    | 60 |
| <b>Tabla 3.2.</b> Números de onda representativos con sus grupos funcionales.                                   | 62 |
| <b>Tabla 3.3.</b> Resumen de valores obtenidos en el ensayo TGA   | 63 |
| <b>Tabla 3.4.</b> Valores nominales de la Tg y Tm para el PLA y PEG.  | 65 |
| <b>Tabla 3.5.</b> Valores obtenidos en el ensayo DSC.   | 67 |
| <b>Tabla 3.6.</b> Señales y grupos funcionales para el quitosano  | 68 |
| <b>Tabla 3.7.</b> Resultados de la determinación de datos para el cálculo del porcentaje de porosidad           | 71 |
| <b>Tabla 3.8.</b> Imágenes tomadas del microscopio óptico y su porcentaje de porosidad experimental             | 72 |
| <b>Tabla 3. 9.</b> Resultados de porosidad teórica para matrices de PLA al 50% y 80% de relleno                 | 73 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 3.10.</b> Solubilidad del PLA y PEG en diferentes solventes [66].....  | 74 |
| <b>Tabla 3.11.</b> Constante de velocidad $K_H$ para las matrices porosas de PLA.....   | 85 |
| <b>Tabla 3.12.</b> Constante de velocidad $K_H$ para las matrices porosas de PLA/PEG 5%.....  | 85 |
| <b>Tabla 3.13.</b> Constante de velocidad $K_H$ para las matrices porosas de PLA/PEG 10%.....                                       | 86 |
| <b>Tabla 3.14.</b> Comparación de la constante de velocidad $K_H$ para las matrices porosas de PLA con y sin quitosano.....         | 88 |
| <b>Tabla 3.15.</b> Comparación de la constante de velocidad $K_H$ para las matrices porosas de PLA/PEG 5% con y sin quitosano.....  | 88 |
| <b>Tabla 3.16.</b> Comparación de la constante de velocidad $K_H$ para las matrices porosas de PLA/PEG 10% con y sin quitosano..... | 89 |



## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de matrices porosas a partir de biopolímeros, que sirvan como soportes o andamios (*scaffolds* en inglés); para almacenar células vivas, fármacos o reparar y regenerar tejidos, es un actual reto en el campo de la ingeniería de tejidos. Muchas complicaciones y problemas como los altos costos, baja eficiencia y largos tiempos de fabricación se han asociado con estas tecnologías, y por lo tanto, la progresión y la aplicación de las matrices poliméricas a gran escala ha sido limitada; este desarrollo, además, busca que estas estructuras puedan liberar de manera controlada y constante fármacos para así mejorar de modo relevante la actual administración de estos en el fluido corporal ante algún problema determinado.

Bajo este contexto, las tecnologías de fabricación de adición de material o tecnologías aditivas por material fundido (AFM) han surgido recientemente como un nuevo grupo de tecnologías para producir estructuras tridimensionales que pueden ofrecer una alternativa viable y más adecuada para fabricar estas matrices mientras se controla de mejor manera su estructura. En la actualidad, varias tecnologías aditivas (*AM: additive manufacturing*) ya se han utilizado en el diseño y fabricación de matrices para aplicaciones biomédicas, incluyendo el modelado por deposición de material fundido (*FDM: Fused deposition modelling*) [1], estereolitografía (*SLA: stereolithography*) [2], la impresión de inyección de tinta y la sinterización selectiva por láser (*SLS: Selective laser sintering*) [3]. En el campo de la ingeniería de tejidos, estas tecnologías de fabricación aditiva permiten la fabricación de matrices personalizadas directamente a una necesidad específica, mediante el uso de un programa, como INVENTOR o SOLIDWORKS, que importa diseños ya establecidos a un formato 3D, empleando una gama de materiales tales como polímeros o cerámicos.

Para este propósito, los equipos de impresión 3D ya se están modificando con la finalidad de mejorar su exactitud y capacidades; sin embargo, aún se consideran como desventajas los altos costos asociados a estas máquinas comerciales, además de los escasos materiales necesarios para la fabricación de las matrices y la dificultad de estudiar los diferentes parámetros que influyen en estos procesos. El desarrollo más actual de la fabricación de matrices porosas poliméricas, por el diseño y exactitud, se basa en la manufactura aditiva, usando la impresión 3D, donde métodos como *solid freeform fabrication* (SFF) [4] y *rapid*

*prototyping (RP)* [5] ayudan a controlar de manera más adecuada las dimensiones geométricas de la pieza.

En los últimos años, los materiales más usados para la obtención de estas matrices porosas funcionalizadas han sido los biopolímeros. El término “biopolímeros” se entiende generalmente como aquellos polímeros que son biodegradables y biocompatibles, es decir, polímeros capaces de degradarse o descomponerse en un período de tiempo definido en moléculas más simples y presentes en el medio ambiente, como el dióxido de carbono, agua o metano, bajo la acción enzimática de microorganismos [6], además de no generar ningún tipo de rechazo o infección en un medio vivo. Algunos polímeros derivados de los recursos naturales, también se les considera como biodegradables y, por lo general, biorreabsorbibles, estos últimos son materiales que se pueden metabolizar en algún organismo vivo [7]. Entre los polímeros sintéticos biodegradables, los más utilizados son los poliésteres alifáticos, como son el ácido poliláctico (PLA) y el polietilenglicol (PEG). El PLA posee entre sus propiedades fisicoquímicas una adecuada biocompatibilidad y biodegradabilidad, además, se procesa fácilmente para producir piezas moldeadas, películas o fibras [8]. Debido a estas propiedades, el PLA tiene una amplia gama de aplicaciones industriales. El PEG posee una variedad de propiedades adecuadas para aplicaciones biomédicas como su buena solubilidad en agua y la capacidad de precipitar y adherir a su superficie proteínas y ácidos nucleicos, considerándosele un polímero no tóxico aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, USA) para el consumo humano, permitiendo la unión covalente con otras moléculas y microorganismos, a la vez que evita la desnaturalización de las proteínas y facilita el acercamiento de otras moléculas para generar una matriz extracelular [9].

El fármaco utilizado para la funcionalización de la matriz porosa polimérica será el ácido úsnico (AU), por sus propiedades antibacterianas y anti fungicidas, las cuales ya están estudiadas [10], más no el efecto en conjunto de ésta distribuida sobre una superficie porosa de PLA/PEG con diferentes tamaños de poro y porcentajes de mezcla. Para mejorar la adherencia y su liberación de modo controlado se usará quitosano, que es un biopolímero de bajo peso molecular, biocompatible y biodegradable, utilizado en muchas aplicaciones biomédicas y particularmente como matrices o andamios en remplazo de tejido [11], además de mejorar la adherencia y compatibilidad en la pieza impresa.

En esta contexto, el objetivo de este trabajo es desarrollar y obtener matrices porosas poliméricas (*scaffolds*) a partir de materiales compuestos constituidos por PLA (ácido

poliláctico) y PEG (polietilenglicol) mediante la técnica de modelado por deposición fundida, utilizada en la impresión 3D, para luego aditivarlo con ácido úsnico y quitosano y, por último, evaluar su liberación controlada en un medio determinado.

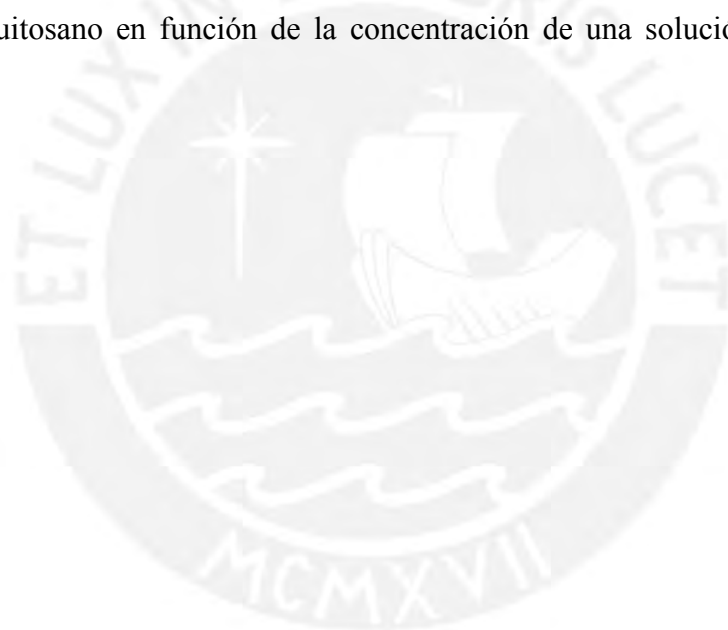
Para el logro de este fin, se tiene los siguientes objetivos específicos:

- Definir el diseño experimental que considere las variables involucradas en la obtención de las matrices porosas y su relación con los ensayos requeridos para el cumplimiento del objetivo general.
- Caracterizar los polímeros a utilizar en la fabricación de filamentos de PLA/PEG con distintas proporciones en peso de PEG, mediante técnicas de TGA, DSC, FTIR y MFI.
- Obtener filamentos, mediante extrusión y según el diseño experimental, que contemple el material de PLA puro y diferentes proporciones de mezclas de los componentes de PLA/PEG así como las variables que otorguen un diámetro constante para su uso como filamento en la impresión 3D.
- Obtener matrices porosas, mediante el uso de la impresora 3D MakerBot Replicator 2X y los filamentos extruidos, definiendo las variables que den un material con mejores propiedades para nuestra aplicación, como diferentes geometrías de impresión, composiciones de PLA/PEG entre otras.
- Caracterizar las matrices porosas obtenidas mediante microscopía óptica y calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- Realizar el estudio de degradación hidrolítica de las matrices porosas obtenidas.
- Aditivar las matrices porosas con ácido úsnico (AU).
- Recubrir las matrices porosas, que contienen ácido úsnico, con una película de quitosano en la superficie para el estudio de su liberación controlada.
- Realizar el estudio de liberación controlada *in vitro* de las matrices porosas elaboradas.
- Determinar el efecto que pueda tener la película de quitosano en la liberación controlada del fármaco.

Este trabajo se ha estructurado en tres capítulos: Fundamentos teóricos, metodología experimental y resultados y análisis.

En el capítulo I, fundamentos teóricos, se resumirán los conceptos teóricos sobre la ingeniería de tejidos y sus diversas aplicaciones y avances, donde también se discutirá acerca de las matrices poliméricas porosas (*Scaffolds*) y las principales tecnologías para su obtención,

como la impresión 3D y muchas de sus aplicaciones; además de los materiales que se usan y sus propiedades, también se verán conceptos acerca de la liberación controlada de fármacos adicionados a estas matrices y como determinar su cuantificación en un fluido vivo simulado. En el capítulo II, metodología experimental, se desarrollará el procedimiento experimental para la obtención de las matrices porosas, los métodos para su caracterización, su degradación hidrolítica y acelerada, así como su aditivación con el ácido úsnico y quitosano, además de la determinación de los parámetros usados para la liberación controlada del fármaco. En capítulo III, resultados y análisis, se presentarán los resultados de la caracterización de los filamentos y aditivos, así como los resultados del estudio de las matrices porosas y su degradación hidrolítica y acelerada. Se concluye este capítulo con las curvas de liberación controlada como resultado de la evaluación de las matrices porosas aditivadas con ácido úsnico y quitosano en función de la concentración de una solución tampón salina en el tiempo.





# CAPÍTULO I

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En este capítulo se resumirán los conceptos teóricos sobre la ingeniería de tejidos y sus diversas aplicaciones y avances, donde también se discutirá acerca de las matrices poliméricas porosas (*Scaffolds*) y las principales tecnologías para su obtención, como la impresión 3D y muchas de sus aplicaciones; además de los materiales que se usan y sus propiedades, también se verán conceptos acerca de la liberación controlada de fármacos adicionados a estas matrices y como determinar su cuantificación en un fluido vivo simulado.

## 1.1. Ingeniería biomédica e ingeniería de tejidos

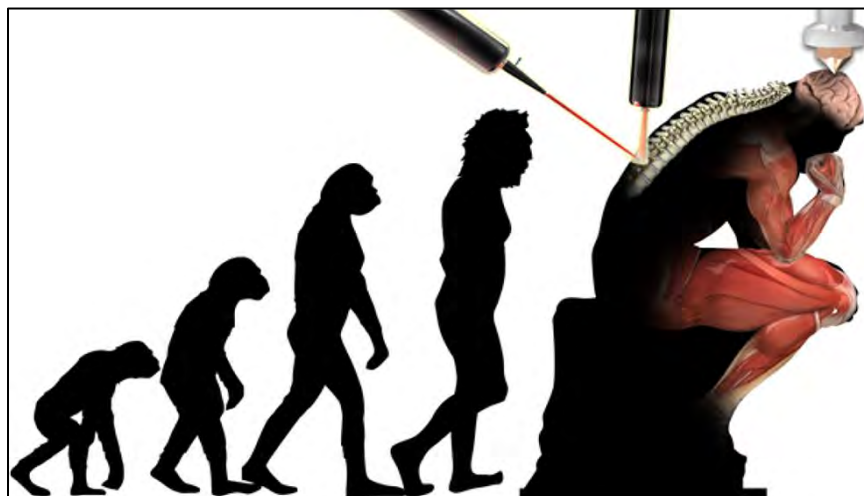
Anualmente, miles de personas sufren por la espera de un trasplante debido a la gravedad en algún órgano dañado, o pasan dolorosas operaciones para curar algún hueso quebrado o por alguna prótesis que sustituya el mismo. Aunque los médicos han tratado de reemplazar la función de los órganos dañados mediante aparatos mecánicos, electrónicos (diálisis y máquinas bypass de corazón-pulmón), o mediante el implante con sustitutos sintéticos (conjunto de vasos sanguíneos, o huesos en forma de prótesis), estas soluciones sólo temporales no permiten que el paciente pueda reanudar completamente sus actividades normales, siendo entre otros problemas, la infección y el rechazo uno de las mayores preocupaciones en estos procedimientos.

La ingeniería biomédica es la unión de principios y técnicas de la ingeniería en el campo de la medicina buscando conseguir un efecto sinérgico en el desarrollo de tecnologías médicas, para encontrar la solución a problemas actuales aún no solucionados o de difícil solución. La ingeniería biomédica es un campo donde los profesionales en medicina llevan sus necesidades a profesionales en ingeniería, para buscar soluciones conjuntas a problemas específicos planteados, entre ellos, el diseñar y desarrollar dispositivos que puedan cumplir con las propiedades y características que requiere un material biológico [12].

Langer y Vacanti, pioneros en esta rama de la ciencia, definieron la ingeniería de tejidos como “un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida al desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función tisular [13]”. Además, el término **ingeniería de tejidos** se definió en el primer encuentro internacional de ciencia patrocinado por la NSF (National Science Foundation, EE.UU.) en 1988, como la “aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia la comprensión fundamental de la relación función-estructura en condiciones normales de los tejidos de los mamíferos y el desarrollo de sustitutos biológicos para la reparación o regeneración de tejidos o funciones orgánicas” [14].

El emergente campo de la ingeniería biomédica podría ayudar a resolver muchos de estos problemas, la visión general de la ingeniería de tejidos en un futuro busca el reemplazo de tejidos esenciales en el cuerpo, como un proceso a la mejora y evolución de la especie a la diseñando y generando mejoras en el cuerpo (Figura 1.1). En las últimas décadas, con la aplicación de estas tecnologías a materiales convencionales como polímeros o metales, se

han conseguido avances importantes en el reemplazo de órganos y tejidos en los organismos vivos. Sin embargo, todavía no existen materiales que puedan reemplazar o ayudar adecuadamente a la regeneración de tejidos funcionales, como por ejemplo los huesos.



*Figura 1.1. Visión y desarrollo a futuro de la aplicación de la ingeniería de tejidos.*

La ingeniería de tejidos ofrece la posibilidad de facilitar la regeneración del tejido dañado por enfermedad o lesión y, en algunos casos, de crear un nuevo tejido y reemplazar órganos con disfunciones. Esto se consigue con el uso de materiales biodegradables que inducen el crecimiento celular y que sirven como matrices temporales de las células trasplantadas, siendo una alternativa de solución a problemas de salud en una población propensa a sufrir del mal funcionamiento de algunos órganos o la pérdida de tejido debidos a una lesión o a una enfermedad reduciendo la calidad de vida de muchos pacientes involucrando importantes costes sanitarios.

### **1.1.1 Las matrices poliméricas porosas (scaffolds).**

Las matrices poliméricas porosas (*scaffolds*), también conocidas como armazones poliméricos o andamios, son un sistema de andamiaje estructural para el cuerpo humano, donde funcionalizados con cerámicos, células y fármacos, pueden generar un nuevo tejido extracelular [12].

Las matrices poliméricas porosas son una parte integral de la ingeniería del tejido, son estructuras biocompatibles tridimensionales que pueden imitar las propiedades que tienen las matrices extracelulares (ECM) tales como el soporte mecánico, la actividad celular y la producción de proteínas mediante interacciones bioquímicas y mecánicas, proporcionando

un ambiente, o plantilla, adecuado para la fijación celular y estimulando la formación de tejido in vivo [4].

A lo largo del tiempo, estos sistemas de andamiaje eran hechos a base de materiales metálicos o cerámicos, usados los primeros por sus buenas propiedades mecánicas y los segundos por su afinidad biológica al tener una superficie mineral adecuada para el intercambio iónico en un medio vivo, estas aplicaciones, muy extendidas a nivel mundial, fueron reemplazadas de a pocos por la alternativa prometedora del uso de materiales poliméricos. En la tabla 1.1 se muestran las ventajas de usar materiales poliméricos a metálicos para el uso de prótesis y medios de andamiaje celular.

**Tabla 1.1.** Comparación entre materiales poliméricos y metálicos usados en prótesis [15]

|                                | Materiales metálicos | Materiales poliméricos |
|--------------------------------|----------------------|------------------------|
| Remediación aguda y a detalle  | Adecuado             | Adecuado               |
| Remediación en un largo tiempo | Sin efecto           | Beneficioso            |
| Remediación endotelial         | Alterado             | Adecuado               |
| Irritación persistente         | Presente             | Ausente                |
| Geometría adecuada             | Alterada             | Preservada             |

### 1.1.2. Partes de una matriz polimérica porosa

Los polímeros biocompatibles, forman parte de la estructura de la matriz, como el soporte o armazón, pero estos tienen como desventaja su poca afinidad a permitir la formación de una capa mineral que genere cargas eléctricas y sea más afín en un medio vivo, así para aumentar esta propiedad se utilizan materiales cerámicos, los cuales aumentan su conductividad y permiten un adecuado medio para la proliferación celular, imitando de mejor manera, como en el hueso humano, su composición química y propiedades superficiales, donde el fósforo, calcio y sodio, son elementos fundamentales en la estructura, estas biocerámicas son biomateriales producidos por sinterización o fundición de materiales inorgánicos, así como también in situ, agregando precursores y modificando el pH de la solución, Existen las biocerámicas absorbibles y activas. Entre los principales cerámicos bioactivos tenemos los siguientes:

- **Fosfato de calcio** estos cristales son biocompatibles y son utilizados frecuentemente para la fabricación de armazones en la regeneración ósea. La formación de apatita con fosfato de calcio es comparada con la fase mineral presente en los huesos y dientes, de esta manera se pueden realizar replicas con muy alta similitud al componente original.
- **Hidroxiapatita**, la cual es un fosfato de calcio cristalino  $(Ca_{10})(PO_4)_6(OH)_2$ . Este material, de tipo cerámico, es el componente mineral principal de los huesos en los mamíferos pues entre el 60 y el 70% del peso del tejido óseo es este compuesto, presentando de acuerdo a su síntesis una estructura muy similar al tejido óseo, lo que provee características de osteoconductividad que permite que el tejido conectivo del hueso que le rodea le penetre y realice un proceso de dosificación del material [16].

### 1.1.3. Propiedades de los matrices poliméricas porosas.

Los materiales poliméricos deben ser biodegradables y biorreabsorbibles, es decir, materiales que se degraden en moléculas presentes en el medio ambiente como dióxido de carbono, agua y metanol, y también en un medio vivo, degradándose en moléculas más pequeñas en conjunto, y ser estos mismos reabsorbidos *in vivo* en el proceso metabólico, para así poder ser eliminados a través de las vías naturales, ya sea debido a la simple filtración de subproductos de degradación o después de su metabolización. La biorreabsorción es, por lo tanto, un concepto que contempla la eliminación total de los productos de degradación en conjunto, sin efectos secundarios residuales, suponiendo la eliminación del polímero de forma total, también implica la eliminación total de algún material extraño inicial y de los subproductos de degradación superficial (compuestos de bajo peso molecular) sin efectos secundarios residuales.

Estos materiales también deben ser bioabsorbibles, es decir, materiales que puedan disolverse en el fluido corporal sin ninguna cadena de polímero grande dividido o la disminución de la masa molecular, como es el caso de la disolución lenta de implantes solubles en agua en el cuerpo. Un polímero bioabsorbible es biorreabsorbible si las macromoléculas dispersadas son excretadas o eliminadas, además de ser biocompatibles, cumpliendo varios requisitos como las propiedades mecánicas y la velocidad de degradación. Entre otras propiedades el andamio o matriz polimérica también deberá cumplir con lo siguiente:

1. No provocar ninguna respuesta adversa local o sistémica importante.
2. Biodegradarse a un ritmo comparable con el proceso de reparación o regeneración.

3. Ser altamente porosos para permitir la entrada de células y nutrientes, esta propiedad se le asocia a tener un tamaño de poro adecuado para la regeneración del tejido, y también para el paso adecuado de células y sustancias de un modo adecuado.
4. Ser altamente permeable para facilitar la difusión, que no sea en lo posible una matriz hidrofóbica, y pueda permitir el paso adecuado del fluido sin un mayor rechazo que el de su estructura.
5. Tener un intervalo de tamaño de poro apropiado.
6. Tener propiedades mecánicas que proporcionen el microambiente de tensión correcto para las células.
7. Poseer una superficie apropiada para la fijación celular, la cual se consigue adicionando los materiales cerámicos que generen ese ambiente adecuado con la concentración de iones necesaria para tal.
8. Promover funciones celulares asistiendo de este modo a la formación de una matriz extracelular.
9. Poseer la capacidad de transportar drogas, fármacos y factores de crecimiento celular.

#### **1.1.4. Métodos de obtención**

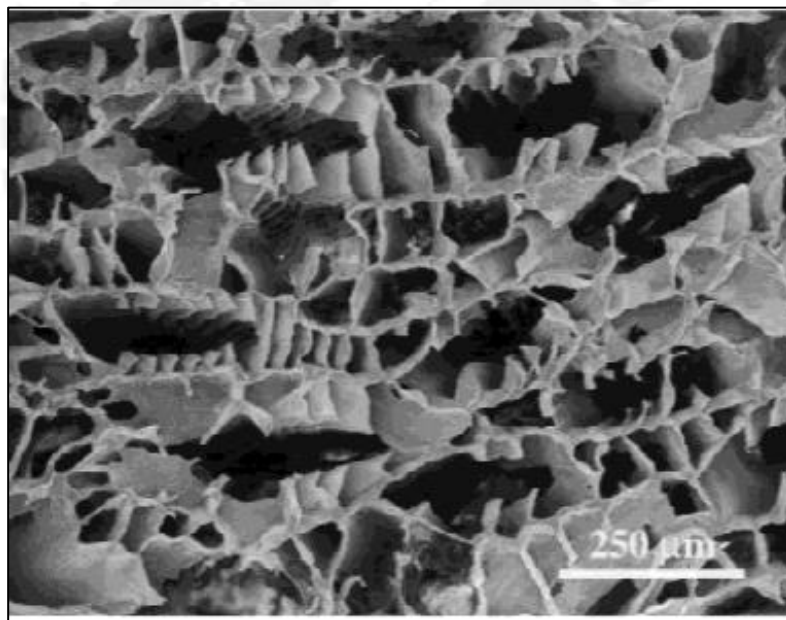
Los métodos de obtención han sido muchos y se han ido usando a largo del tiempo en muchas investigaciones, siendo considerados estos, como métodos tradicionales para la obtención de matrices poliméricas, se ha definido entre ellos muchas síntesis químicas y de polimerizado, se tiene entre los más importantes a los siguientes:

##### **a. Uso de disolventes y laminación**

La elaboración de estas matrices, fabricando láminas y tubos planos disolviendo el polímero en un solvente adecuado dentro de un molde, eliminando luego el disolvente por evaporación. La porosidad se puede lograr por lixiviación solubilizando las partículas en algún medio determinado o por liofilización [17]. Como ejemplo de ello, se obtuvieron tubos planos de PLGA/PLLA a través de laminación de membrana para la regeneración de los huesos largos y vasos sanguíneos [18]. Las láminas planas adquiridas por la evaporación del solvente y laminación de membrana son también útiles para la liberación controlada de fármacos y proteínas [19].

## b. Separación de fases

Este método de obtención implica separar fases fluidas que contienen diferentes componentes, es decir, sólido-líquido o líquido-líquido, iniciándose la misma por cambios térmicos o químicos. En la separación de fase sólido-líquido, el polímero se separa del disolvente cuando el disolvente en la solución de polímero cristaliza [20], se desarrollaron como ejemplo andamios de poliéster con poros dispuestos de modo isotrópico, utilizando un conjunto paralelo de microtubos de carbón. En la separación de fases líquido-líquido, la solución polimérica se separará en fases ricas y deficientes en polímero. Las estructuras porosas se forman después de que el disolvente se elimina, pudiéndose observar esta estructura mediante una micrografía SEM (Figura 1.2). La porosidad y el tamaño de poro pueden controlarse mediante el uso de determinados disolventes, la concentración de polímero, la velocidad de cristalización y el gradiente de temperatura usado para la polimerización.

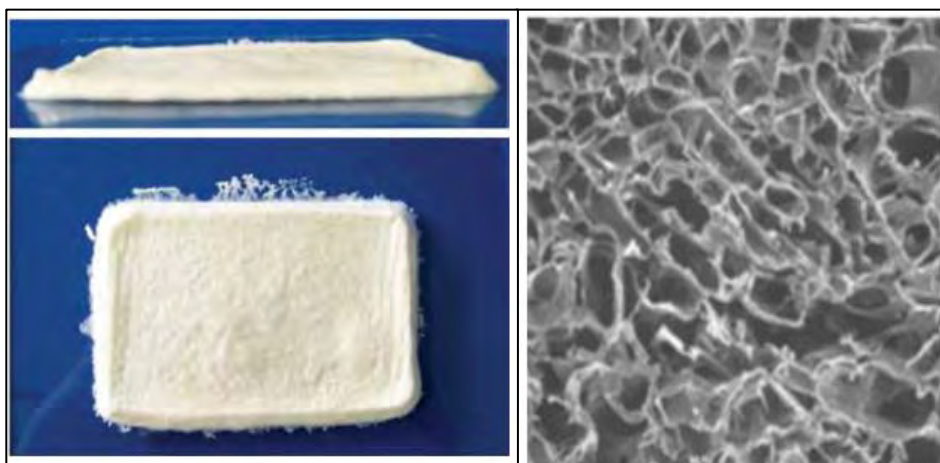


*Figura 1.2. Micrografía SEM de material poroso de PLLA/PLGA preparado mediante la técnica de separación de fases [20].*

## c. Liofilización

También llamada secado en frío, se genera formando una emulsión, homogenizando una mezcla de polímero disuelto en un solvente determinado y agua, seguida de un enfriamiento rápido de la emulsión para inmovilizar la estructura original en estado líquido. La liofilización se utiliza para eliminar el disolvente y el agua, así crear una estructura porosa

(Figura 1.3). Entre algunas de sus aplicaciones, se han fabricado estructuras de polióxido de etileno tereftalato (PEOT)/politereftalato de butileno (PBT) por liofilización. Para combinar la liofilización con la lixiviación en partículas, se añade en algunos casos sacarosa (400-700 mm de tamaño de partículas) o cloruro de sodio (500-700 mm) a las soluciones, estas generarán una estructura porosa, después de haber sido liofilizadas a 0,04 mbar de presión durante 48 h a temperatura ambiente, lavándose con agua para disolver las partículas durante 48 h. [21].



*Figura 1.3. Imagen liofilizada de un scaffold quitosano/colágeno. A la derecha su micrografía SEM notándose los poros en la misma [28].*

#### **d. Polimerización *in situ***

Los andamios porosos también se pueden fabricar por polimerización *in situ*, sin ser necesaria la eliminación del solvente o lixiviación con sales, siendo los principales problemas de este método, la pequeña cantidad de polímero que se puede sintetizar, la temperatura alta que se necesita y los aditivos metálicos usados que pueden afectar negativamente la biocompatibilidad final de la pieza. Una matriz polimérica porosa de policaprolactona (PCL) adecuada para la regeneración ósea, se sintetizó, como ejemplo de este método, usando polietilenglicol para la formación de los copolímeros respectivos, por polimerización en bloque con apertura del anillo de la caprolactona (Figura 1.4), realizándose la polimerización en vacío a 140°C durante 20 días, introduciendo etilenglicol como iniciador y usando zinc metálico como catalizador [23]. Para la biocompatibilidad se usaron cerámicos que puedan servir de enlazantes para materiales inorgánicos a la estructura polimérica, como ejemplo un diisocianato biocompatible a base de lisina en cada extremo, también se mezcló con



hidroxiapatita o fosfato tricálcico. Así se desarrollaría una red porosa óptima para el crecimiento óseo dentro del implante [24].

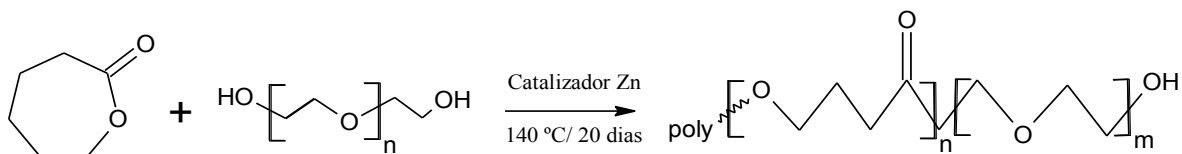


Figura 1.4. Síntesis polimérica de la policaprolactona con polietilenglicol [29].

## 1.2. Impresión 3D

La impresión 3D, también conocida como fabricación aditiva (AM), prototipado rápido (RP), o tecnología de forma sólida libre (SFF), fue desarrollada en un inicio por Charles Hull en el departamento de ingeniería física de la universidad de Colorado, Hull y sus compañeros trabajaron en la fabricación de dispositivos plásticos con fotopolímeros a inicios de los años 80, teniendo entre algunos problemas e inconvenientes, las imperfecciones en el diseño, requiriendo de varios ensayos y repeticiones para mejorar la técnica de polimerización mediante irradiación de luz UV, siendo Hull el que sentó los principios para que en el futuro se mejoren los métodos para el desarrollo de prototipos, obtenido en 1986, la patente para un método que denominó estereolitografía [25], desarrollando muchos avances en esta tecnología, estableciendo el mismo año la empresa 3D Systems, desarrollando el formato de archivo .STL (*Stereo Lithography*), que junto al formato CAD ya existente, permitieron transmitir archivos para la impresión de objetos 3D. Es así que desarrolla la primera impresora 3D denominada “Aparato de estereolitografía”, así como la primera impresora 3D comercial disponible para el público en general, la SLA-250. Con el trabajo de Hull, además del desarrollo patentado del método de deposición fundida (FDM) por Scott Crump [26] en Stratasys en 1990, se aprovecharon de la propiedades de fluidez de algunos polímeros a ciertas temperaturas para diseñar objetos 3D, revolucionando la fabricación y la investigación de estructuras con geometrías determinadas para diferentes áreas. Los profesores del MIT Michael Cima y Emanuel Sachs patentaron el primer equipo denominado “impresora 3D” en 1993 para imprimir piezas de plástico, metal y cerámica [27]. Muchas otras compañías desarrollaron impresoras 3D para aplicaciones comerciales, como DTM Corporation, Z Corporation, Solidscap y Objet; otros incluyen Helisys y Organovo, compañías que imprimen objetos de tejido humano vivo, Ultimaker y otras opciones de código abierto como

RepRap, la cual usa una impresora 3D de escritorio capaz de replicar la mayoría de sus propias piezas, todas estas impresoras, disponibles desde 2008 [28], [29].

La tecnología de impresión 3D ha encontrado diferentes aplicaciones en la industria automotriz y aeroespacial para la obtención de prototipos de partes de automóviles y aviones, en la arquitectura e ingeniería civil, para la impresión de modelos estructurales y en la industria de bienes de consumo para el desarrollo de prototipos para empresas como Trek y Black and Decker [28]. Las aplicaciones de la impresión 3D en defensa y de uso militar han sido rápidamente desarrolladas para el prototipado de armas, además de su utilidad en ciencias médicas, donde el uso se remontan a principios de los años 2000, con la producción de implantes dentales y prótesis, también surgiendo aplicaciones en la industria alimentaria, tanto como en la moda. En cuanto a la investigación médica y científica, la impresión 3D se ha limitado a las aplicaciones biomédicas y la ingeniería, mostrando una gran aplicación potencial en las ciencias químicas para el desarrollo y modelado de nuevas sustancias y compuestos [30].

Se describe en un esquema cómo se desarrollan las aplicaciones para este tipo de tecnología, mostrándose en la figura 1.5, las etapas para la obtención de una matriz polimérica para una determinada aplicación, donde se observa que, al ser esta tecnología personalizada y aplicada a un caso específico y determinado, se toman medidas y se determina la geometría de la pieza, ya que con esta tecnología 3D se puede controlar las dimensiones con un buen grado de exactitud, luego en un programa computacional, se hace un diseño de la misma y con uno de los métodos de impresión 3D se obtiene la pieza buscada, se caracteriza para determinar algunas propiedades como su resistencia mecánica y tamaño de poro, y se evalúa su biocompatibilidad y degradabilidad al injertarla en la zona afectada [31].

### **1.2.1. Métodos de impresión**

La tabla 1.2 muestra según la norma ASTM F2792 [31] los principales métodos de impresión de manufactura aditiva. Se describirán brevemente alguno de los métodos más importantes de cada tipo.

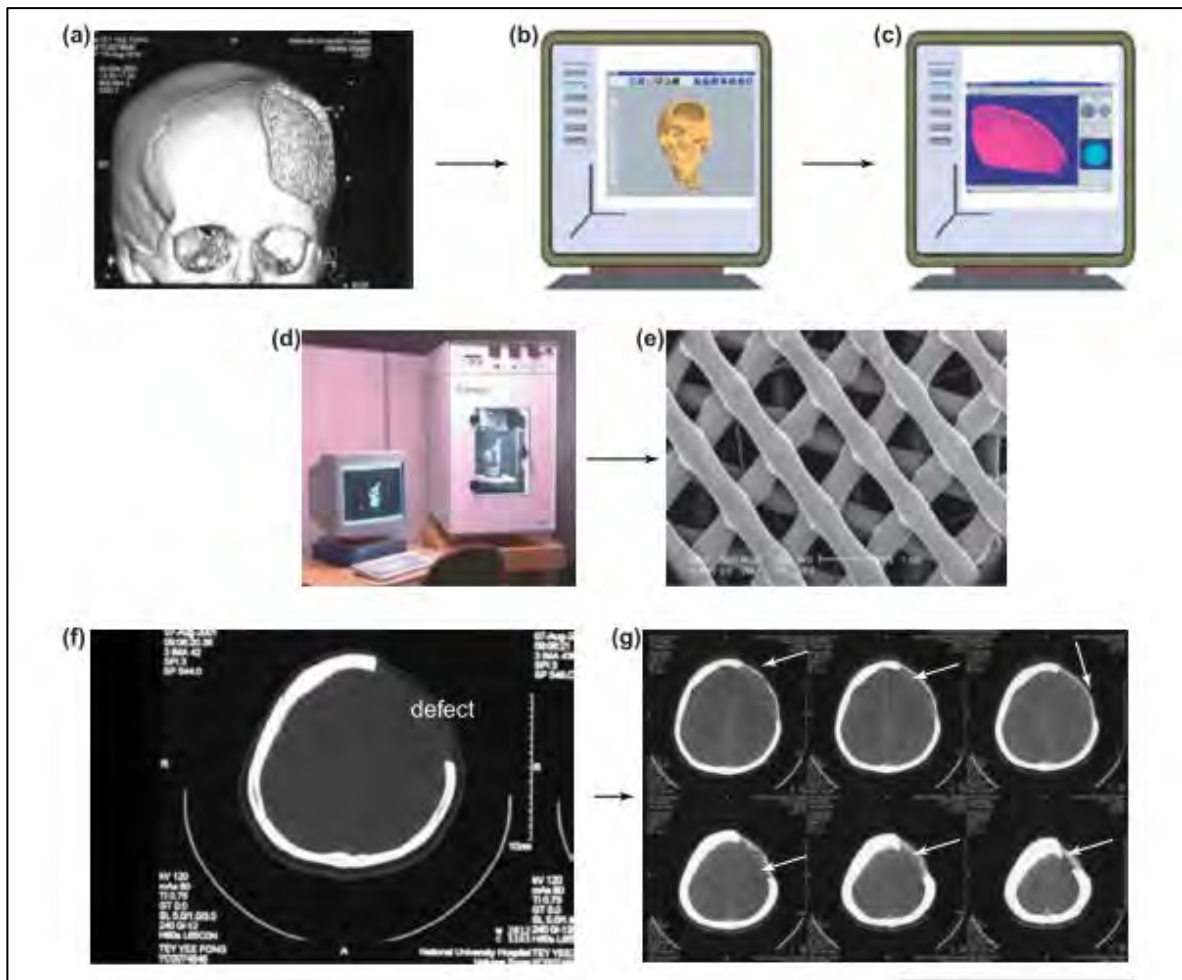


Figura 1.5. Proceso para la obtención de una matriz polimérica para un determinado caso. **a.** Identificación del problema corporal. **b.** Modelado computacional. **c.** Diseño en programa STL. **d.** Obtención de la pieza impresa. **e.** Caracterización mediante imágenes SEM. **f.** implantación en el organismo vivo. **g.** Evaluación en la regeneración del tejido[31].

### a. Estereolitografía (SLA)

Este método fue desarrollado por primera vez en 3D Systems por Chuck Hull, siendo el primer método de prototipado rápido comercializado, consiste en polimerizar una resina fotosensible mediante radiación selectiva de un láser en el rango UV [28]; una vez iniciada la polimerización el láser UV colocado encima del baño líquido fotopolimerizable, crea una primera capa de plástico sólido justo debajo de la superficie del baño, en este proceso de polimerización el láser repite el proceso para generar capas subsiguientes trazando un haz a lo largo de los límites de diseño y llenando la sección transversal 2D del modelo entre las capas, una lámina cargada con resina nivela la superficie para asegurar una capa uniforme de líquido antes de otra ronda de exposición de luz UV, este proceso se repite hasta que el objeto

3D esté completo [33]. Los polímeros líquidos fotopolimerizables ya utilizados incluyen derivados de acrilato de PEG, metacrilato de PEG, alcohol polivinílico (PVA) y polisacáridos modificados tales como ácido hialurónico y metacrilato de dextrano [34].

**Tabla 1.2.** Clasificación de los principales métodos de impresión [31].

| Terminología y clasificación ASTM para los métodos de obtención de matrices porosas |   |
|---|---|
|   | Estereolitografía (SLA)                               |
| Tanque de fotopolimerización  | Procesado con luz digital (DLP)                       |
| Material inyectado  | Modelado de inyección múltiple de tinta (MJM)         |
| Material extruido   | Modelado por deposición fundida (FDM)                 |
|   | Fusión de haz de electrones (EBM)                     |
| Fusión en cama de polvo   | Sinterizado por láser selectivo (SLS)                 |
|   | Sinterizado por temperatura selectiva (SHS)           |
|   | Sinterizado por láser directo al metal (DLMS)         |
| Inyección de aglutinante  | Inyección de impresión 3D en una cama de polvo (PBIH) |
|   | Impresión 3D basada en yeso (DMLS)                    |
| Laminación de hojas   | Manufactura de objeto laminado (LOM)                  |
|   | Consolidación por ultrasonido (UC)                    |
| Energía directa de deposición   | Deposición por láser en metal (LMD)                   |

Los dos tipos de SLA más usados para este método son el *direct/laser writing* (Figura 1.6.A) y *mask-based writing* (Figura 1.6.B). En la primera configuración, el haz UV traza una sección transversal 2D sobre una base sumergida en un tanque de resina fotoactiva que se polimeriza tras la exposición al láser.

El espesor de la resina curada depende de muchos factores tales como la duración a la exposición del haz, la velocidad de barrido y la intensidad de la fuente de alimentación, que dependen de la energía de la luz UV. El segundo método, contiene una plataforma móvil, un recipiente con resina fotopolimerizable, una computadora y el haz de luz UV, así como una “máscara” en forma de un dispositivo de espejo digital que permite el curado de una sola capa a la vez. Una vez completada la sección transversal 2D, la base baja en la resina una distancia predefinida, el haz UV comienza la adición de la capa siguiente, que polimeriza encima de la anterior capa. Entre las capas, una cargada con resina nivela la superficie para asegurar una capa uniforme de líquido antes de otra ronda de exposición a la luz UV. Este proceso se repite, capa por capa, hasta que el objeto 3D se completa. Entre los inconvenientes usuales se tiene el tamaño del recipiente con polímero líquido que restringe la altura del objeto deseado, y residuos de resina que requieren de procedimientos de limpieza extensos [28].

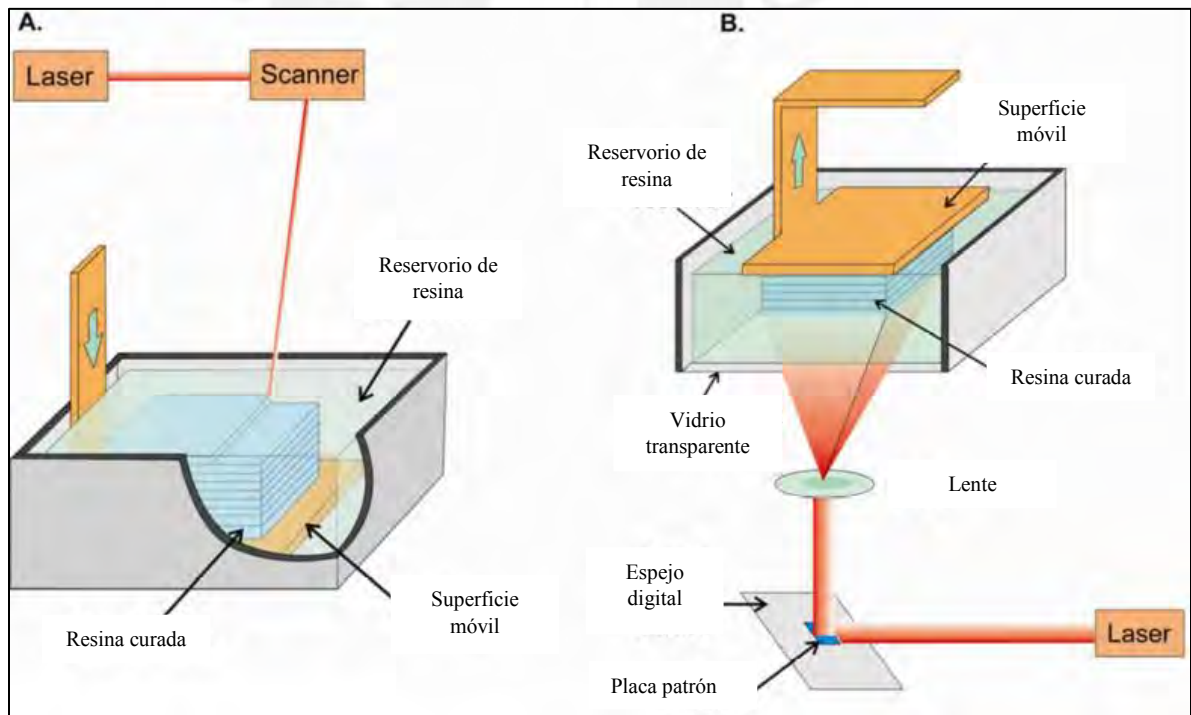


Figura 1.6. Esquema de las configuraciones del método de SLA [28].

## b. Impresión por inyección múltiple de tinta (MJM).

La impresión por chorro de tinta fue desarrollada en 1878 por Rayleigh, siendo patentado por Siemens en 1951, con la primera impresora de tipo chorro de tinta bidimensional (2D) llamada dispositivo de chorro de tinta Rayleigh. Desde un inicio se usó mucho en la industria comercial, principalmente para tintas de impresión en papel, cuando en 2001, comenzó a ser utilizado para imprimir estructuras a partir del método sol-gel para polímeros conductores, materiales cerámicos, metálicos y de ácidos nucleicos o proteínicos [35], [36]. Esta técnica, desarrollada en Stanford en los años sesenta, requiere de placas electrostáticas en el cabezal de la impresora para dirigir las gotas de tinta sobre el papel para imprimir. Principalmente es un método en polvo en el que las capas de partículas sólidas, típicamente de 200  $\mu\text{m}$  de altura con tamaños de partícula comprendidos entre 50 y 100  $\mu\text{m}$  [37], están unidas por un material líquido para generar un modelo 3D.

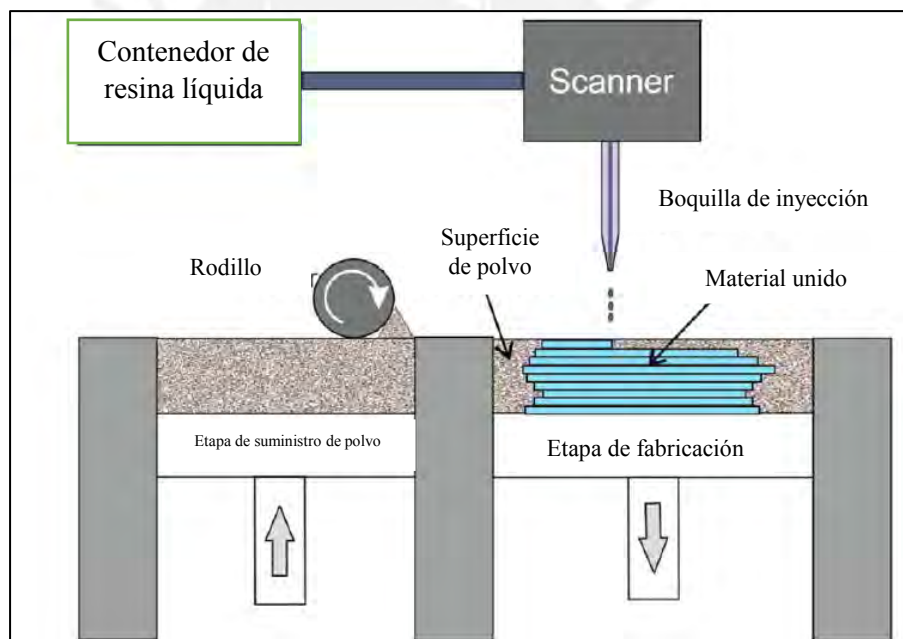


Figura 1.7. Disposición esquemática de la impresión por chorro de tinta

La primera capa de polvo se distribuye uniformemente en la parte superior de una etapa de soporte, después de lo cual un cabezal de impresora de chorro de tinta imprime pequeñas gotas de material de unión líquido sobre la capa de polvo en áreas determinadas de solidificación. Una vez completada la primera capa, la superficie desciende y se distribuye una segunda capa de polvo y se combina selectivamente con material de unión impreso. Estas etapas se repiten hasta que se genera un modelo 3D, después de lo cual el modelo es generalmente se trata térmicamente para generar la sinterización de los polvos en las regiones

deseadas. El polvo sin unir sirve como material de soporte durante el proceso y se retira después de la fabricación, sin la necesidad de usar polímeros fotosensibles o resinas complicadas de limpiar (Figura 1.7). Los polvos de materiales poliméricos, cerámicos o de vidrio se pueden combinar con materiales líquidos para generar un modelo 3D, siendo una de las técnicas más usadas en áreas como el diseño de arte y el modelado industrial [37].

### **c. Modelado de deposición por fusión (FDM).**

Desarrollado por Scott Crump en la empresa Stratasys, el método FDM es una de las tecnologías de fabricación más utilizadas por el prototipado rápido en la actualidad. El FDM diseña un modelo 3D mediante la extrusión de materiales termoplásticos y la deposición de los materiales semifundidos capa por capa [38],[39]. Como se muestra en el proceso esquemático de la figura 1.8, los filamentos termoplásticos, material utilizado para construir estos modelos 3D, son movidos por dos rodillos debajo de la punta de la boquilla del extrusor de un cabezal de impresión, donde son calentados por resistencias que aumentan controladamente la temperatura a un estado semifundido.

Los materiales se extruyen fuera de la boquilla y se solidifican en las áreas deseadas. La base entonces baja y otra capa se deposita de la misma manera. Estos pasos se repiten para fabricar una estructura 3D capa por capa. El contorno de la pieza suele imprimirse primero, con las estructuras internas impresas capa por capa. Los defectos superficiales de este proceso en particular incluyen efectos de acabados en forma de escalera como se muestran en la figura 1.9, de naturaleza común del software de corte y el formato de archivo .STL. Los defectos internos pueden ser el resultado de heterogeneidades en el diámetro y densidad de alimentación del filamento, ya que pueden afectar la forma en que el material se extruye desde la boquilla de la impresora [40].

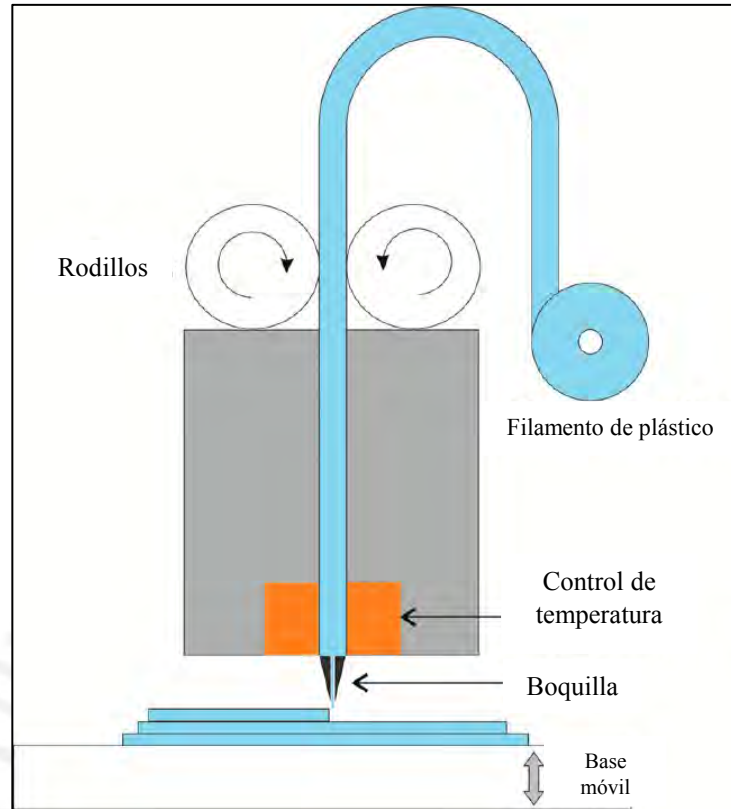


Figura 1.8. Esquema del proceso de impresión por FDM [40]

Una ventaja notable de FDM es que puede crear objetos fabricados a partir de múltiples tipos de material imprimiendo y cambiando posteriormente el material de impresión, lo que permite un mayor control para la fabricación de dispositivos para uso experimental. Además de materiales convencionales como Policaprolactona (PC), Poliestireno (PS), PLA y ABS, el método FDM también puede imprimir modelos 3D de polímeros reforzados con vidrio, de metal, cerámicas, y materiales biorreabsorbibles [41].

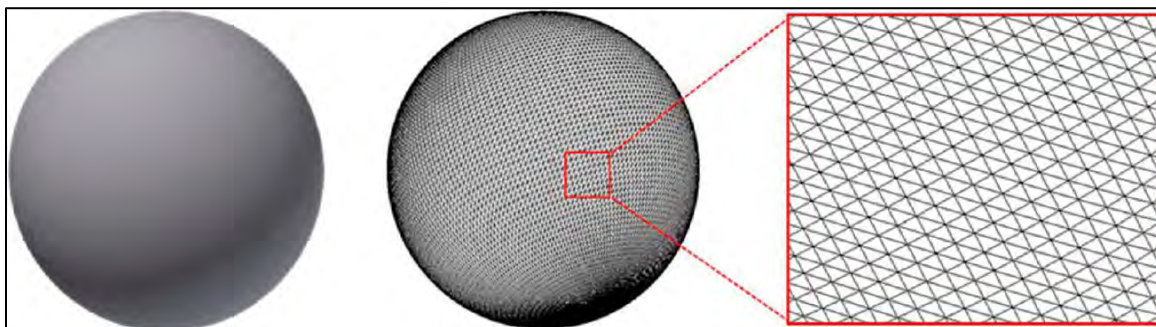


Figura 1.9. Defectos superficiales de la impresión 3D, efecto de la escalera [39].



### 1.3. Materiales poliméricos para la ingeniería de tejidos

Las matrices porosas deben ser fabricadas a partir de polímeros biodegradables como se mencionó en la introducción, estos polímeros son materiales sólidos que rompen su cadena polimérica debido a la degradación macromolecular por dispersión en un medio que simule las condiciones de un fluido corporal, llamado también *in vivo*, sin generar algún residuo tóxico o que no pueda eliminar el cuerpo (esta definición excluye la degradación ambiental, por hongos o degradación bacteriana) que no tengan el riesgo de provocar una reacción inmunológica o dejar como residuo algún radical o molécula extraña en el fluido corporal. El polímero elegido puede degradarse a una velocidad controlada de acuerdo con la regeneración del tejido. Los productos de degradación no deben ser tóxicos y deben ser fácilmente excretados por vías metabólicas [42].

En la actualidad se usan diferentes materiales para la fabricación de estas matrices. Estos materiales son ampliamente utilizados para la fabricación de dispositivos biomédicos en la ingeniería de tejidos debido a que ofrecen ventajas de biocompatibilidad, versatilidad química y propiedades biológicas, las cuales son importantes para la medicina regenerativa. Estos materiales son clasificados según su estructura química, características biológicas y modo de obtención. Entre estos tenemos en la figura 1.10 una forma de poder clasificar a los mismos.

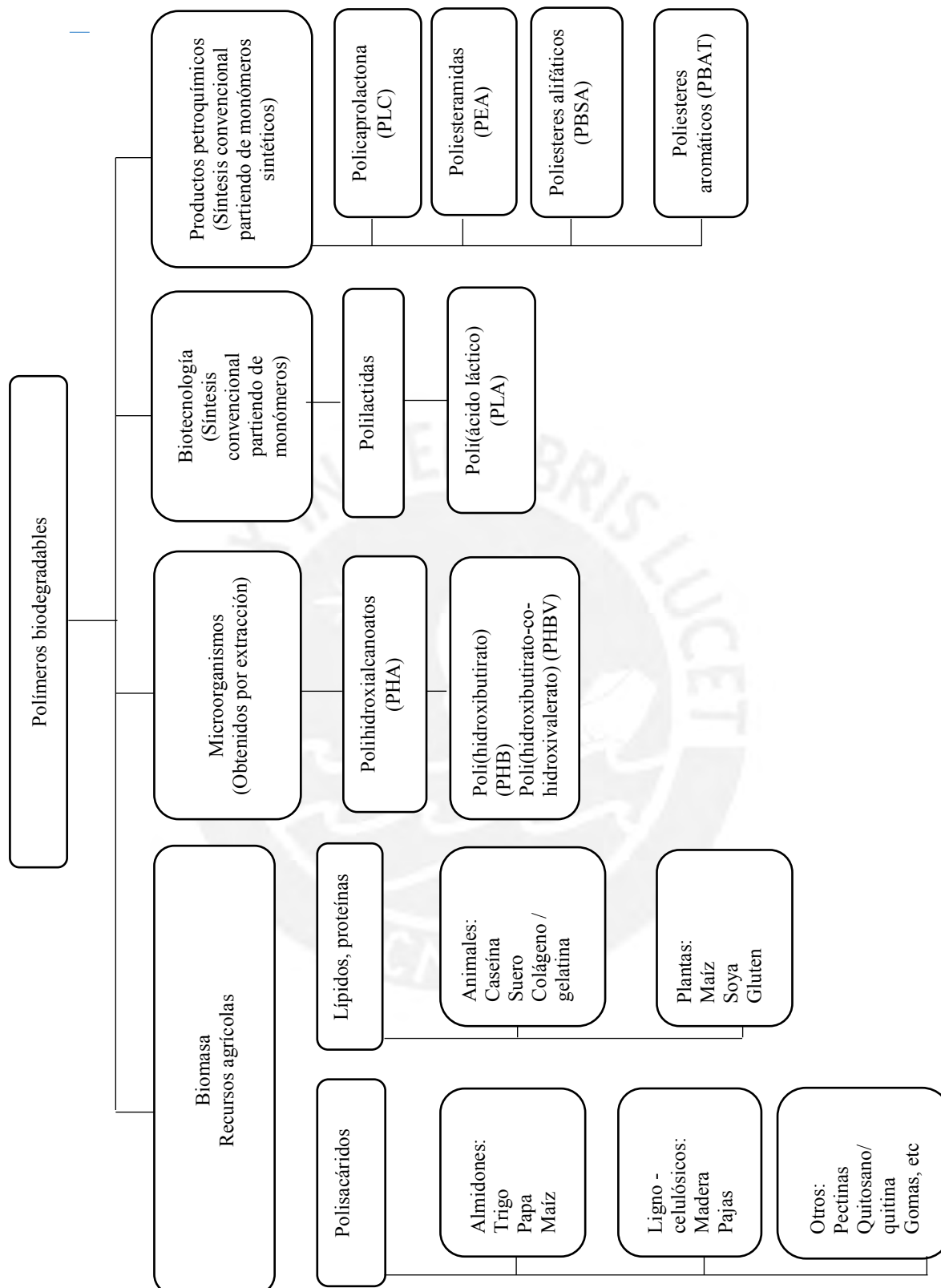


Figura 1.10. Clasificación de los polímeros biodegradables [42].

Algunos también tienen su origen de los recursos naturales, siendo utilizados frecuentemente para aplicaciones biomédicas debido a su propia estructura natural, la cual ejerce mejores interacciones con las células en la piel. Entre las principales se tiene:

**Agarosa:** el cual es un polisacárido que posee alta rigidez, buena biocompatibilidad las cuales son propiedades ideales para algunos tipos de armazones especiales.

**Quitosano:** es un polisacárido derivado de la quitina, el cual es extraído de los caparzones y esqueletos de los crustáceos por desacetilación. Este polímero posee un alto índice de biocompatibilidad in vivo y su velocidad de degradación puede ser controlada por su cantidad de radicales acetilo en su estructura [43].

**Colágeno:** es una proteína fibrosa usada frecuentemente para regenerar la piel. Existiendo más de 22 tipos de colágeno presente en el cuerpo humano. El colágeno es utilizado debido a su capacidad de mejorar la proliferación de las células en el soporte y así acelerar el proceso de cura de la lesión [44].

Los materiales obtenidos naturalmente tienen la ventaja de reconocer biológicamente las células, pudiendo generar de buena forma la adhesión celular y su funcionalización, pero pueden inhibir la inmunogenicidad y contener impurezas patógenas, así como un menor control sobre sus propiedades mecánicas y su biodegradabilidad.

Una ventaja de los polímeros sintéticos, a comparación de los anteriores, es su producción a gran escala y su amplio rango de propiedades controladas como son la resistencia mecánica, velocidad de degradación y microestructura, por lo que los polímeros sintéticos biodegradables han sido ampliamente utilizados como vehículos, matrices o medios para el trasplante de células y el reemplazo de órganos en la ingeniería de tejidos [45]. Estos polímeros poseen propiedades físicas y mecánicas comparables al tejido corporal, deben poseer además la capacidad de biodegradarse por hidrólisis sin dejar residuos tóxicos ni generar rechazo biológico en el cuerpo como infecciones o residuos no degradables, como son los siguientes tipos:

- Poliesteres alifáticos, polímeros de cadena lineal con ramificaciones, que se caracterizan por poseer buena biocompatibilidad, controlada biodegradabilidad y un buen y fácil procesamiento para las diferentes técnicas de impresión. Entre los más conocidos tenemos

al PLA (ácido poliláctico), PCL (Policaprolactona), PGA (poliácido glicólico), PEG (polietilenglicol).

- Poli anhídridos, son un poco inestables en su síntesis. Estos polímeros son utilizados con frecuencia debido a la mejora mecánica-física que presentan a los soportes. Poseen excelente biocompatibilidad en vivo y su velocidad de degradación es más predecible que los Poli (hidroxi esterés).
- Polietilenglicol, este polímero hidrofílico controla y restringe la adherencia de las células y proteínas en la matriz polimérica. Los trabajos con PEG muestran que este mejora la adherencia de las células y mejora la biocompatibilidad del material compuesto.

Los polímeros sintéticos más utilizados son los poliésteres alifáticos, debido a su fácil degradación por la hidrólisis del enlace éster en el fluido corporal, provocado por la acción enzimática de ciertas sustancias que hacen que pueda metabolizarse, se pone énfasis en este trabajo, en el PEG (Polietilenglicol) y el PLA (Ácido poliláctico), los cuales pueden romper sus cadenas generando degradación, el agua se difunde en las zonas amorfas de los polímeros para luego propagarse por sus áreas cristalinas, el PLA se degrada en ácido láctico que luego puede formar dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ). La bioactividad se genera con la adición de materiales cerámicos como la hidroxiapatita (HA), o el fosfato tricálcico (TCP), que en conjunto simulan la composición y propiedades biológicas del tejido óseo [46].

### 1.3.1. Ácido poliláctico

Uno de los biopolímeros más prometedores y capaz de sustituir a los polímeros derivados del petróleo para aplicaciones industriales es el ácido poliláctico (PLA). El PLA es un poliéster termoplástico alifático lineal obtenido 100% de los recursos renovables, como el azúcar, el maíz, la papa, la caña, remolacha, etc. La ruta más común para la producción industrial de PLA de alto peso molecular es la polimerización del monómero de lactida, abriendo el anillo formado a partir de ácido láctico, que es producido por la fermentación de los recursos agrícolas renovables, mostrándose un desarrollo del proceso de obtención en la figura 1.11 [47]. El PLA industrial está compuesto principalmente de poli (ácido L-láctico) (PLLA) y poli (L-D-ácido láctico) (PLDLA), siendo el isómero L de la fracción el componente principal. El PLA posee propiedades fisicoquímicas interesantes como la biocompatibilidad y biodegradabilidad. Además, es fácilmente procesado para obtener diferentes formas estándares, para producir piezas moldeadas, películas o fibras [48]. Debido a estas

propiedades, el PLA tiene una amplia gama de aplicaciones industriales y médicas.

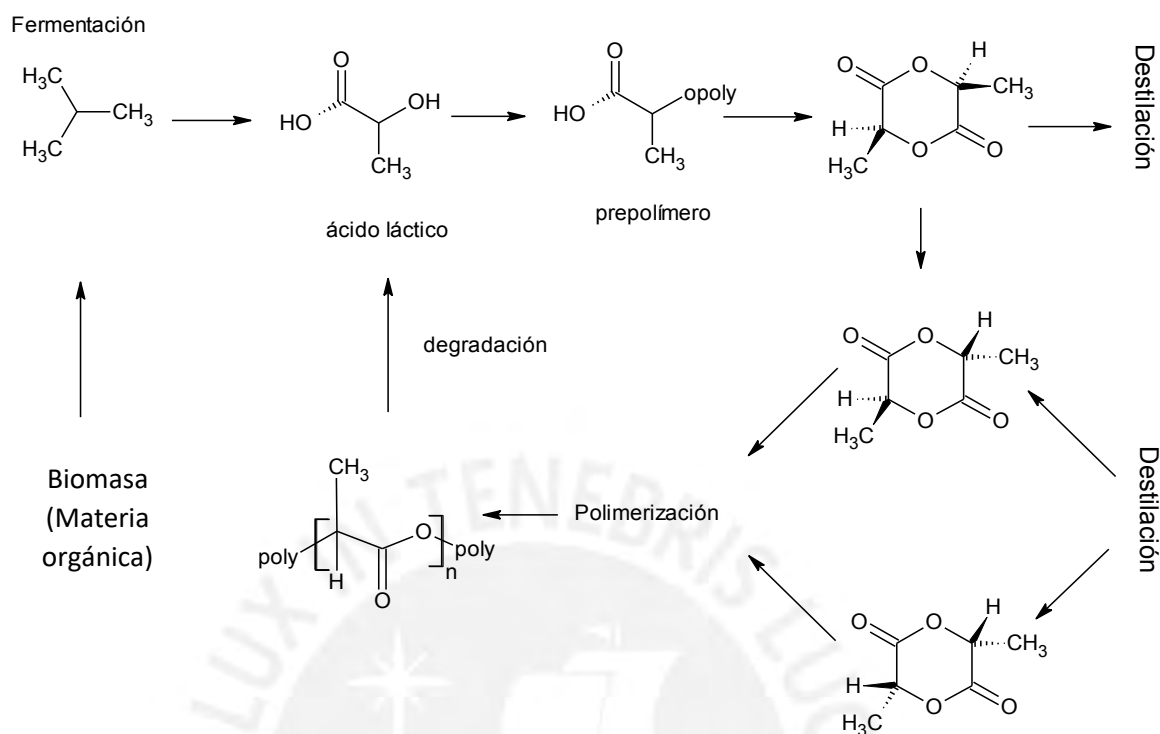


Figura 1.11. Proceso para la obtención actual de PLA [47].

### 1.3.2. Polietilenglicol (PEG)

Es una molécula lineal de variable peso atómico la cual es soluble en agua y diferentes solventes orgánicos. Su fórmula química se presenta en la figura 1.12, donde n nos indica la longitud de la cadena polimérica, y por ende, su peso molecular.

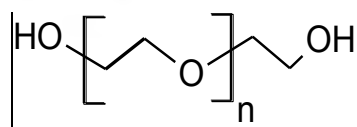


Figura 1.12. Estructura química del PEG [37]

Donde n representa la cantidad de monómeros presentes en el polímero, definiendo su peso molecular, las terminaciones de sus cadenas en grupos OH, hacen que esta molécula sea una sustancia hidrofílica, pudiendo disolverse en agua, propiedad muy útil para la generación de estructuras porosas y promover la proliferación de células y microorganismos de mejor manera que en un polímero hidrofóbico como es el PLA.

El polietilenglicol o PEG, es un poliéster lineal o ramificado, neutro, disponible en una amplia variedad de pesos moleculares, soluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos. A pesar de su aparente sencillez sin muchos grupos funcionales, esta molécula es de mucho interés en la biotecnología y biomedicina. Principalmente esto se debe a que el PEG es muy adecuado para combinarse con otros polímeros y disolverse cuando está en un medio acuoso, esta propiedad genera una mejor afinidad por las proteínas, formación de sistemas bifásicos con otros polímeros, su no inmunogenicidad y no antigenicidad. Además, el polímero no es tóxico y no daña las proteínas o células activas, interactuando con las membranas celulares. Es adaptable a la modificación química y a la fijación a otras moléculas y sustratos, y cuando está unido a otras moléculas afecta muy poco en su química y propiedades, controlando su solubilidad y aumentando su tamaño. Estas propiedades, han dado lugar a una serie de importantes aplicaciones [9] entre las que se tiene:

- Separación biológica ya que el PEG disuelto en un medio acuoso, aísla las moléculas y proteínas de otras rodeándolas, separándolas selectivamente evitando que estas se absorban.
- Enlace entre las moléculas y las superficies ajenas a ellas, ya que el enlace OH crea un puente tipo hidrógeno que genera esa propiedad.
- Control de la electroósmosis, quiere decir que evita un flujo de corriente contrario al ya establecido, cuando se disuelve en solución, generando un movimiento celular en un solo sentido.
- Forma enlaces PEG-enzimas para interactuar de modo adecuado con la membrana celular. [9].

### **1.3.3. Quitosano**

El quitosano es uno de los más importantes y estudiados polímeros naturales. La naturaleza catiónica del quitosano hace que sea un polímero de alta importancia desde el punto de vista medioambiental y biomédico entre los polisacáridos naturales.

Se obtiene a partir de la quitina, polímero natural que está presente en la piel de algunos crustáceos, o de especies marinas, el proceso se llama desacetilación y consta de retirar los grupos acetilo de su estructura para reemplazarlos por grupos amino en la misma, de modo que se va obteniendo la estructura del quitosano, con cierto porcentaje de grupos acetilo y

amino, cuando estos se reemplazan completamente, se tiene una estructura denominada quitano [59] representados en la figura 1.13.

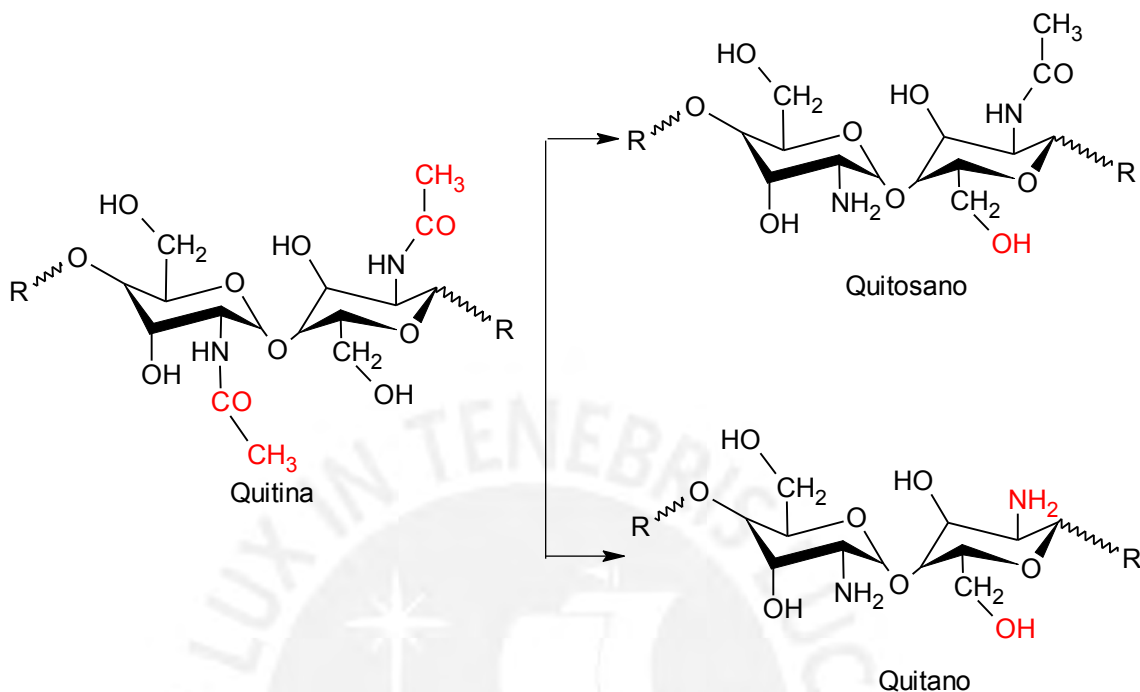


Figura 1.13. Estructura de la quitina, quitosano y quitano [59].

La quitina, precursor del quitosano, es obtenida en su mayoría, a partir de exoesqueletos de camarón. Donde estos residuos fueron separados de sus caparazones, para luego ser lavados con agua, quitando los restos orgánicos que pudieran estar presentes. Los exoesqueletos obtenidos, fueron secados en una estufa a 60-70 °C, ya estando secos y libres de cabezas, patas y colas, se sometieron a un proceso de molienda y tamizado buscando obtener un polvo con tamaños de partícula menores a 250 μm. Se lleva a cabo luego un proceso de desmineralización de los exoesqueletos, para lo cual, se coloca en un matraz la muestra conteniendo una solución de HCl 0.6 N en una relación 1:11 sólido-líquido a una temperatura de 30°C durante 3-4 horas. Posteriormente, se realiza la desproteinización de la muestra con una solución de NaOH al 1% a una temperatura de 30°C durante 24 horas con agitación constante para asegurar una completa reacción. La quitina obtenida, se somete al proceso de desacetilación, mediante el cual, es convertida en quitosano; para ello se pesó una cantidad de la quitina obtenida y se vertió en una solución de NaOH al 50% en una relación 1:4 sólido-líquido, por 2 horas a 60°C y luego por 2 horas a 100°C. El producto obtenido es el quitosano. En cada una de las etapas del proceso, el producto obtenido fue lavado con agua destilada hasta obtener un pH neutro.

#### 1.4. Liberación controlada de fármacos

Los medicamentos así como su administración y liberación controlada en el cuerpo han sido y son un tema de estudio de ya mucho tiempo. Una formulación y dosificación adecuada al paciente incluye adicionalmente técnicas de fabricación de dosis variables en el tiempo, que permiten un cambio preciso y dinámico de la dosis en respuesta a las necesidades del paciente. Este concepto puede llegar a ser de importancia cuando se incluye una amplia gama de dosis o del ingrediente farmacéutico activo (con sus siglas **API**) con una ventana terapéutica estrecha en el plan terapéutico del paciente. Es de gran interés proporcionar un sistema de control de dosis eficaz y seguro para pacientes ambulatorios que pueda ser controlado de forma remota y digital por un proveedor de atención médica [49].

Los sistemas de liberación modificada se definen como sistemas en los que la velocidad, el lugar o el momento de liberación de la sustancia o sustancias activas es diferente al de la forma farmacéutica de liberación convencional administrada por la misma vía [50].

Dado que las tabletas orales siguen siendo la forma de dosificación más común en los pacientes, existe una creciente demanda en la producción más ajustable a cada necesidad en particular. Los métodos tradicionales de fabricación de tabletas requieren típicamente el uso de grandes lotes de materiales, múltiples etapas de producción, instalaciones designadas y costosas operaciones. El alto costo de este enfoque, combinado con su naturaleza rígida, hizo de esta rama el enfoque menos adecuado para aplicarla en la medicina personalizada [51]. Un método de producción que enfrente los nuevos desafíos de la medicina personalizada, busca ser altamente ajustable a una necesidad particular, asequible, de espacio mínimo requerido, controlable en el fluido vivo e inocuo.

Varios métodos de impresión 3D controlados mediante procesos computacionales han sido desarrollados para producir tabletas orales como una alternativa a la tabletización convencional, entre los cuales se tienen en la tabla 1.3 algunos de los estudios realizados con diferentes fármacos y materiales poliméricos.



**Tabla 1.3.** Algunos estudios sobre liberación controlada de fármacos

| Matriz polimérica  | Fármaco  | Descripción  | Referencia |
|--|--|--|------------|
| Hidroxiopropilmetilcelulosa<br>Etil celulosa<br>Polivinilpirrolidona | Acetaminofeno<br>(APAP)                              | El diseño se basó en un lecho de polvo donde se depositó una solución de aglutinante conteniendo el fármaco, seguido de una impresión capa por capa.         | [52]       |
| Polivinil alcohol  | Fluoresceína   | Impresión 3d por deposición fundida de filamento cargado con fármaco.  | [53]       |
| Polivinil alcohol  | Ácido 5-aminosalicílico.<br>Ácido 4-aminosalicílico. | Deposición de material fundido cargado con diferentes porcentajes de fármaco.  | [54]       |
| Hidroxiopropil Trietil<br>celulosa                                   | Teofilina  | Pellets de polímeros y fármaco se extruyen para obtener filamentos cargados con fármaco e imprimir discos cargados de fármaco                                | [55]       |
| PVA (Polivinilalcohol)   | Fluoresceína   | Filamento cargado con fármaco antibacterial, se estudia la influencia de cambiar el grado de porcentaje de relleno en la liberación de la matriz cilíndrica. | [49]       |

Sin embargo, hay poca investigación disponible sobre el uso de FDM en la fabricación de formas de dosificación, así como la precisión del peso y la dosificación de esta técnica de fabricación. Dado que las tabletas orales siguen siendo la forma de dosificación más común

entre los pacientes, existe una creciente demanda de un método de producción versátil y altamente ajustable de tabletas. Entre las ventajas que se puedan encontrar a estos métodos se encuentran las siguientes:

- Se logra una administración local de la droga, la acción de la droga es más efectiva, ya que a diferencia de la administración por vía oral o por perfusión, los virus u organismos extraños son atacados directamente.
- Se logra un mayor control de la enfermedad en cuestión.
- Los efectos secundarios perjudiciales son menores.
- Evita terapias por períodos prolongados.
- Evita administraciones simples de altas concentraciones del medicamento por vía sistémica.

En una matriz polimérica cargada, dopada o aditivada de fármaco, la velocidad de liberación del fármaco es importante para determinar la concentración que el paciente recibirá en un determinado período de tiempo; de ser esta mayor a la necesaria podría ocasionar una intoxicación; si fuese menor, el fármaco sería ineficaz [67].

Para el uso de las matrices poliméricas porosas, se emplean métodos de liberación por difusión, determinados por la United States Pharmacopeia (USP) [68]. El modelo matemático más usado para matrices sólidas porosas es el desarrollado por Higuchi teniendo como requisito que la solubilidad del fármaco en el medio a analizar haya sido probada. Este modelo está basado en la Ley de Fick, empleando la denominada ecuación 1 simplificada de Higuchi [56]:

$$M_t/M_0 = Q = K_H t^{1/2} \dots\dots\dots \text{(Ecuación 1)}$$

Donde  $M_t$  es la concentración del fármaco en el tiempo,  $M_0$  es la concentración en un tiempo muy largo (Se asumirá 100% en nuestro caso),  $K_H$  es la constante de velocidad que determinaremos en este medio, y  $t$  el tiempo en horas.

#### 1.4.1. La ley de BOUGUER-LAMBERT-BEER

Para poder cuantificar el fármaco liberado en un medio determinado se utilizará esta relación, también llamada ley de Beer-Lambert-Bouguer, la cual fue definida de diferentes formas y de modo independiente, en primer lugar por el matemático y astrónomo francés Pierre

Bouguer en 1729, luego por el filósofo y matemático alemán, Johann Heinrich Lambert en 1760 y por último el físico y matemático también alemán, August Beer en el año 1852. Esta ley trata de un método matemático utilizado para expresar de qué modo la materia absorbe la luz. En óptica, la ley de Beer afirma que la totalidad de luz que emana de una muestra puede disminuir debido a tres fenómenos de la física, que serían los siguientes:

1. El número de materiales de absorción en su trayectoria, lo cual se denomina concentración.
2. Las distancia del trayecto óptico es la distancia que la luz debe atravesar a través de las muestra.
3. Las probabilidades que hay de que el fotón de esa amplitud particular de onda pueda absorberse por el material. Esto es la absorbencia o también coeficiente de extinción. La relación anterior puede ser expresada en la ecuación 2.

$$A = \epsilon * d * c \dots \dots \dots \text{(Ecuación 2)}$$

Donde, **A**=Absorbancia,  **$\epsilon$** =Coeficiente molar de extinción, **d**=Recorrido (en cm)  
**c**=Concentración molar.

#### 1.4.2. Ácido Úsnico

El ácido úsnico es uno de los compuesto liquénico más estudiado en los últimos años, porque sus isómeros ópticos muestran un amplio espectro de actividad fisiológica frente a diferentes tipos de bacterias como neumococos, estreptococos y estafilococos; además, tienen actividad antibiótica buena frente a diferentes tipos de bacterias de la familia Mycobacterium. Asimismo, se ha conseguido ampliar considerablemente el campo de acción para la antibiosis de estos ácidos por la obtención de derivados. El ácido úsnico, cuya estructura muestra 2 grupos aromáticos según se muestra en la figura 1.14, es un compuesto químico frecuente en líquenes, variando su concentración según la especie, y factores que se determinen en la caracterización de estas plantas.

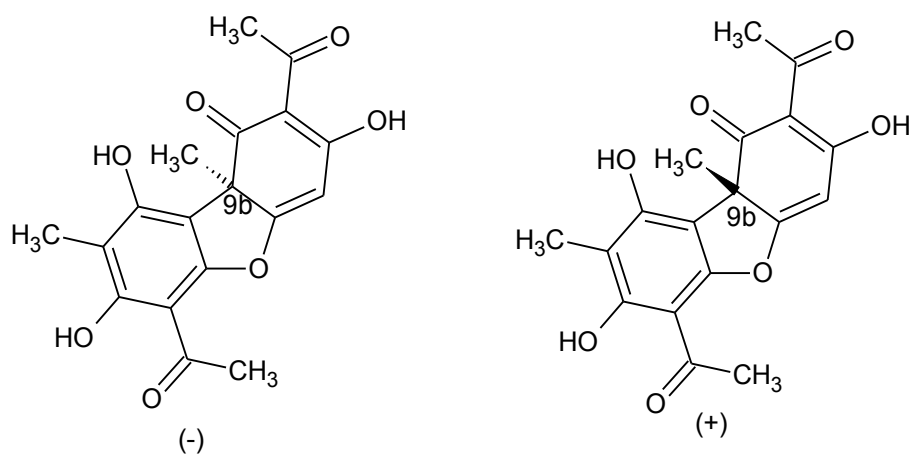


Figura 1.14. Estructura de los enantiómeros ácido (-) úsnico del ácido (+) -úsnico. El centro estereogénico se muestra en la posición 9b [57].

Entre algunas de sus propiedades se tienen estudios sobre su actividad fisiológica, de las pruebas disponibles, por ejemplo, se evaluaron los efectos fisiológicos del ácido úsnico en dos especies cultivadas de *lichen alga Trebouxia*, demostrando que exponiendo especies de *Trebouxia* a la sal sódica de ácido úsnico, resultó en la inhibición del crecimiento de la planta y del proceso de fotosíntesis.

## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

En el presente capítulo, se desarrollará el procedimiento experimental para la obtención de las matrices porosas, los métodos para su caracterización, su degradación hidrolítica y acelerada, así como su aditivación con el ácido úsnico y quitosano, además de la determinación de los parámetros usados para la liberación controlada del fármaco.

## **2.1. Descripción de los equipos**

### **2.1.1. Extrusora de doble husillo VICCO S.A.**

Se usara para la fabricación de los filamentos una extrusora de doble tornillo Labtech Scientific LTE26 40L/D, Labtech Engineering Company Ltd., Tailandia (Figura 2.1) la cual cuenta con:

- Dos tornillos cogiratorios de 26 mm de diámetro cada uno, hechos de acero de alta dureza con superficie nitrurada.
- 10 barriles de calentamiento, los cuales están hechos de un acero especial endurecido a más de 60 HRC con lo que se puede llegar a temperaturas de extrusión de hasta 400°C, cada barril cuenta con un enfriamiento por agua.
- Un alimentador de simple tornillo de velocidad variable, con agitador.
- Una bomba de vacío ubicada en la última zona de calentamiento, con una válvula de regulación de vacío de hasta -1bar (Figura 2.1 b), así también posee una trampa de resina y un filtro de protección de malla de acero inoxidable.
- Motor de 15 kW de potencia.
- Velocidad de los tornillos de hasta 800RPM, así también se cuenta con un limitador de torque para evitar la sobrecarga en los tornillos.
- Boquilla de 4 orificios para producir 4 hileras de filamentos.
- Un plato rompedor a la salida del extrusor, que sirve para cambiar de un flujo en espiral a un flujo axial (Figura 2.1. c).



a



b



c

*Figura 2.1. a. Extrusora de doble husillo; b. Bomba de vacío; c. Plato rompedor*

### **2.1.2. Horno de convección**

Los filamentos, así como las piezas impresas y los fármacos serán secados en el horno de convección de la figura 2.2, para así evitar problemas al momento de la impresión 3D, el cálculo en la humedad, y el moldeo por extrusión. Este horno de convección puede llegar hasta una temperatura de 300°C, estando conectado a una red monofásica de 220V.



*Figura 2.2. Horno de convección del laboratorio 4*

### **2.1.3. Plancha de calentamiento con agitación**

La plancha de calentamiento con agitación usada para la liberación controlada del fármaco (Figura 2.3), es de la marca HEIDPHOL, con una velocidad de agitación entre 100 a 1400 rpm, con una temperatura que va de 20 a 300 °C y un diámetro de disco de 140 mm.

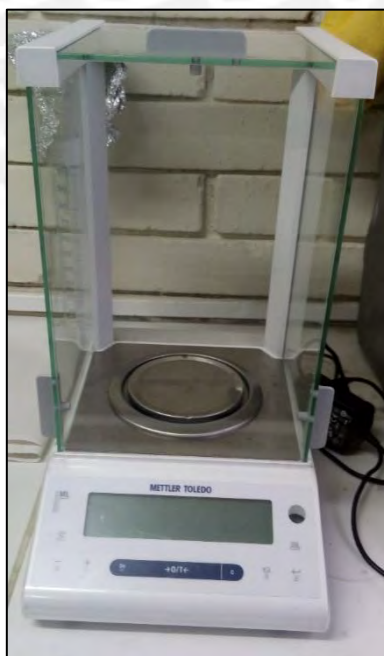




*Figura 2.3. Plancha de calentamiento*

#### **2.1.4. Balanza analítica METTLER TOLEDO**

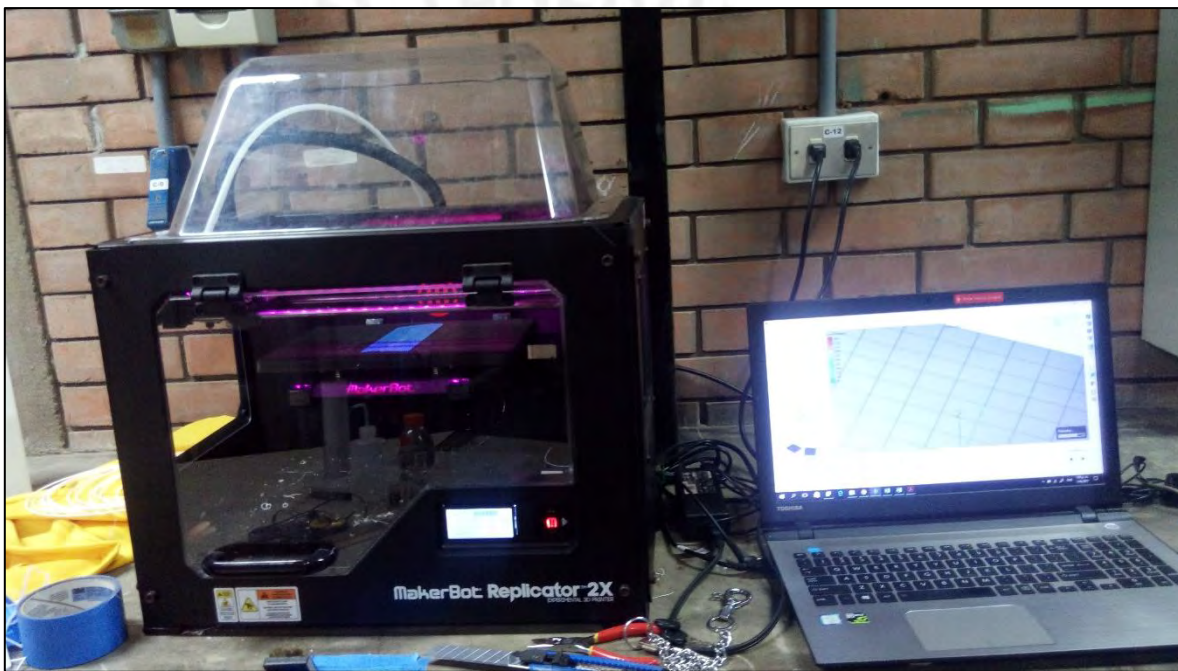
Para el pesado tanto de los pellets de PLA y PEG, así como el fármaco, se usó una balanza digital METTLER TOLEDO con una precisión de 0.0001 y una capacidad máxima de 200 g. (Figura 2.4)



*Figura 2.4. Balanza analítica Mettler Toledo*

### 2.1.5. Impresora Makerbot Replicator 2X

Para las pruebas de impresión 3D y la fabricación de muestras para los ensayos realizados, se usara una impresora 3D MakerBot® Replicator™ 2X de MakerBot Industries, USA. La cual se basa en la técnica de manufactura por adición de material fundido (FDM), con una capacidad de volumen máximo de impresión de 24.6x15.2x15.5cm, una resolución en el eje Z de hasta 100  $\mu\text{m}$ , usando como insumo filamentos de polímeros de  $1.75 \pm 0.5$  mm de diámetro. Esta impresora cuenta con dos extrusoras para imprimir materiales distintos a la vez, boquillas de extrusión de 0.4mm de diámetro, una plataforma con temperatura adecuada y programable a nuestra necesidad y una tapa superior de acrílico para mantener la temperatura constante al interior (Figura 2.5).



*Figura 2.5. Impresora 3D MakerBot Replicator 2x*

## 2.2 Descripción de los materiales

### 2.2.1 Ácido poliláctico

Para la elaboración de filamentos de PLA/PEG al 5% y 10%, se utilizó granzas o *pellets* de PLA, el cual se adquirió de la fábrica NatureWorks (USA) con un grado comercial de 4043D, el cual tiene una densidad de  $1,24 \text{ g/cm}^3$  como un peso molecular medio de 74000 Da. Este se compró en línea en la tienda Revolve 3D USA proporcionado en bolsas con contenido de 2 libras. Se usó además, para la impresión, filamentos de PLA NatureWorks 4043D. Sea para

la granza así como para el filamento, se tienen las siguientes propiedades resumidas en la tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Propiedades físicas y químicas del ácido poliláctico.

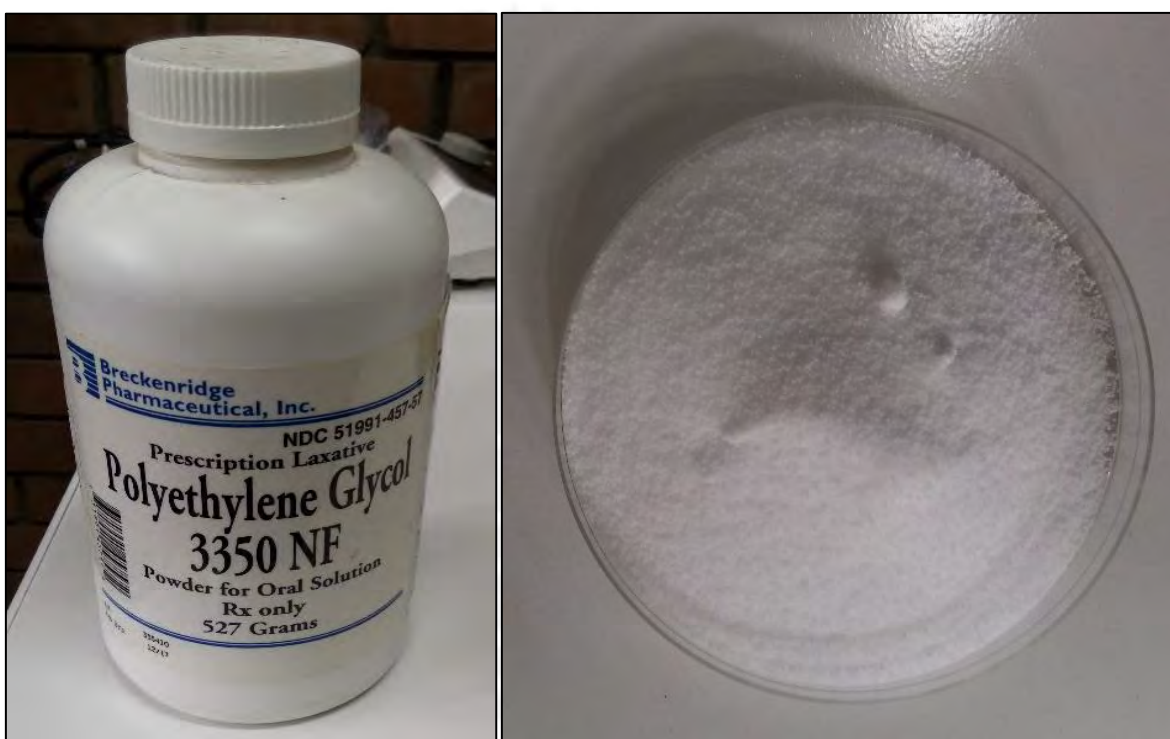
| <b>Propiedades físicas</b>                        |               | <b>Método ASTM</b> |
|---|---------------|--------------------|
| Densidad Específica (g/cc)                        | 1.24          | D792               |
| MFI (g/10min)                                     | 6             | D1238              |
| Viscosidad relativa                               | 4.0           | D5225              |
| Color   | Transparente  | -                  |
| Temperatura de fusión Tm (°C)                     | 145-160       | D3418              |
| Temperatura de cristalización Tc (°C)             | 55-60         | D3418              |
| <b>Propiedades mecánicas</b>                      |               |                    |
| Resistencia a la tracción psi (Mpa)               | 8700 (60)     | D882               |
| Resistencia de tracción a la rotura psi(Mpa)      | 7700 (53)     | D882               |
| Módulo de tensión, psi (Mpa)                      | 5240000 (3.6) | D882               |
| Alargamiento de tracción, %                       | 6             | D882               |
| Energía de impacto con entalladura ft-lb/in (J/m) | 0.3 (16)      | D256               |
| Esfuerzo de flexión psi (Mpa)                     | 12000 (83)    | D790               |
| Módulo de flexión psi (Mpa)                       | 550000 (3.8)  | D790               |

### 2.2.2 Polietilenglicol (PEG)

Se usó un polietilenglicol 3350 NF, el cual contiene 100 % de PEG con una masa molecular promedio  $M_w \approx 33500$  Da, en forma de polvo blanco de la marca ALDRICH este es un polvo blanco utilizado para la reconstitución oral de sales y sustancias en el cuerpo, además de ser un agente osmótico para el tratamiento del estreñimiento. Teniendo un peso molecular medio de 3350. La fórmula química es  $HO (C_2H_4O)_n$  en la que n representa el número medio de grupos oxietileno presentes en su cadena polimérica. Por debajo de  $55^\circ C$ , es un polvo blanco soluble en agua, con algunas propiedades descritas en la tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Propiedades del PEG

| <b>Propiedades físicas y químicas</b> |                          |
|---------------------------------------|--------------------------|
| Apariencia                            | Polvo blanco             |
| Viscosidad (CST 210°F)                | 76-110                   |
| Masa molecular                        | 3015 – 3685              |
| Contenido de agua                     | ≤ 1%                     |
| pH (5% agua a 25°C)                   | 4.5 – 7.5                |
| Espectro infrarrojo                   | Conforme a su estructura |



*Figura 2.6. Polietilenglicol utilizado para la obtención de nuestras matrices poliméricas*

### **2.2.3. Quitosano**

El quitosano de masa molecular 1450 KDa, y un grado de desacetilación del 81,5% en peso, fue proporcionado por el químico Nino Olivio, de la facultad de química de la PUCP, siendo

este un sólido blanco en forma de pequeñas hojuelas, soluble en ácido acético diluido al 5% y 10%, formando películas conforme se evapora este solvente.



*Figura 2.7. Quitosano proporcionado en la PUCP para la funcionalización de la matriz polimérica*

#### 2.2.4. Reactivos

Los reactivos usados para la preparación de las diferentes soluciones usadas en el desarrollo de la tesis, se muestran en la tabla 2.3, así como para la determinación y cuantificación del fármaco en solución.

**Tabla 2.3.** Reactivos usados para la parte experimental de la tesis

| Reactivo                             | Marca                 |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Ácido Úsnico                         | Proporcionado en PUCP |
| Cloroformo para análisis             | MERCK                 |
| Alcohol metílico para análisis       | MERCK                 |
| Sulfato de calcio químicamente puro  | BAKER                 |
| Ácido clorhídrico para análisis      | ALDRICH               |
| Bifosfato de sodio químicamente puro | BAKER                 |
| Cloruro de sodio                     | MERCK                 |
| Cloruro de magnesio hexahidratado    | MERCK                 |
| Trisetilendiaminometano              | MERCK                 |
| Acetona                              | MERCK                 |
| Ácido acético                        | MERCK                 |
| Cloruro de potasio                   | MERCK                 |

## 2.3. Ensayos de caracterización

### 2.3.1. Índice de fluidez

Se desarrollará según la norma ASTM D1238 [8], para ello se trabajará con pesas de 2.16 kg, en donde los filamentos obtenidos se cortarán en pellets para los ensayos. Los pellets pueden tener un tamaño máximo de 3 mm. La cantidad de muestra por ensayo se encuentra en el rango de 3 a 5 gramos y depende del volumen que ocupe el mismo.

Se utilizara el equipo para ensayo de fluidez Zwick Roell BMF-003 (Figura 2.8) el cual cuenta con pesas de variada masa para ensayos de diversos materiales. El tipo de reloj que maneja es analógico y la configuración para los ensayos en la presente investigación se hicieron usando una pesa de masa 2,16 kg y a 170, 180 y 190°C para filamentos de material PLA, PLA/PEG 5% y PLA/PEG 10% respectivamente.



Figura 2.8. Equipo MFI laboratorio 4 de mecánica.

### 2.3.2. Espectro infrarrojo de transformada de Fourier FTIR

El análisis cualitativo por espectrometría infrarroja (IR) es realizado para la identificación de grupos funcionales o mediante la comparación de espectros de absorción IR de materiales desconocidos con los de materiales de referencia conocidos. Se hizo este ensayo, en el laboratorio CITE de la facultad de ingeniería mecánica de la PUCP, según la norma E1252 [59], en el cual se utilizó el método de transmisión o de reflectancia total atenuada (ATR)

con control térmico entre 25 °C y 200 °C, se prepararon películas de polímeros disolviendo los filamentos de PLA/PEG en cloroformo, y el quitosano para tener una superficie adecuada para la lectura, con el objetivo de obtener grupos funcionales característicos de cada polímero y así corroborar la estructura química de cada uno de ellos (Figura 2.9) .

Para el ácido úsnico, se usó el método de la pastilla de bromuro de potasio (KBr), usando una muestra en polvo mezclada y compactada en KBr, sustancia inerte al espectro IR, se determinó así en el espectro obtenido los grupos funcionales del ácido úsnico, para correlacionarlo con su estructura química ya conocida.



*Figura 2.9. Equipo FTIR del laboratorio CITE de la PUCP*

### **2.3.3. Análisis termogravimétrico TGA**

El análisis termogravimétrico (TGA) se llevó a cabo utilizando un equipo NETZSCH STA 449 F1 Júpiter® con analizador de TGA (Figura 2.10) con rango de exploración de 35 °C a 800 °C, a una velocidad de calentamiento constante de 10 °C/min y un flujo continuo de nitrógeno. La temperatura de degradación térmica teniendo en cuenta eran la temperatura de inicio ( $T_{onset}$ ) y la temperatura de la pérdida de peso máxima ( $T_{end}$ ).



Figura 2.10. Equipo TGA NETZSCH STA 449 F1 Júpiter® del CITE.

### 2.3.4. Calorimetría de barrido diferencial DSC

Según la norma D3418 [60], “Transition Temperatures and Enthalpies of Fusion and Crystallization of Polymers by Differential Scanning Calorimetry”, se llevó a cabo este ensayo usando el equipo NETZSCH STA 449 F1 Júpiter®. (Figura 2.11), donde se estudió las características térmicas de los filamentos obtenidos de PLA, PLA/PEG 5% y PLA/PEG 10%, haciendo un primer calentamiento a 10°C/min, de 30°C a 200°C, manteniendo por 5 minutos esta temperatura, luego enfriando a 20°C/min, hasta 25°C, para luego hacer un segundo calentamiento a 10°C/min, hasta los 200°C, registrando la gráfica correspondiente en modo “endo up”, siguiendo el programa dado por el equipo en la figura 2.9.b

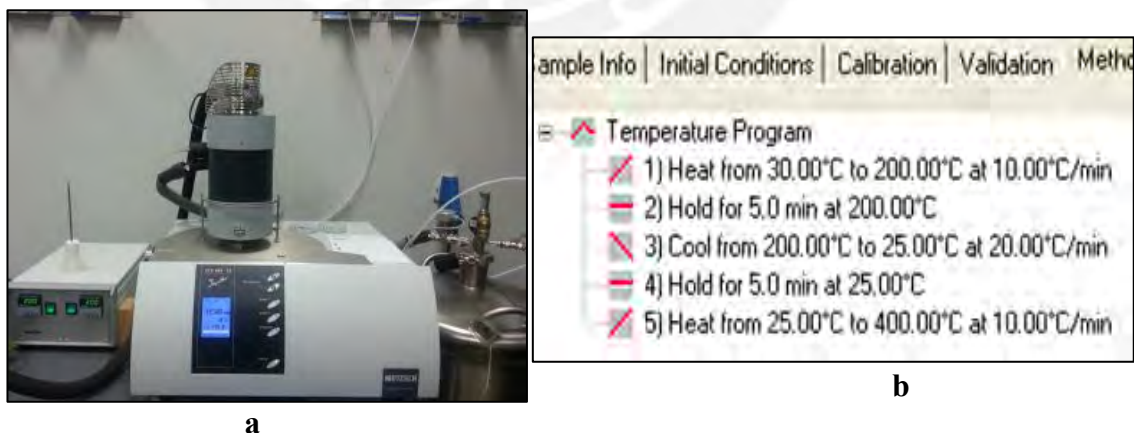


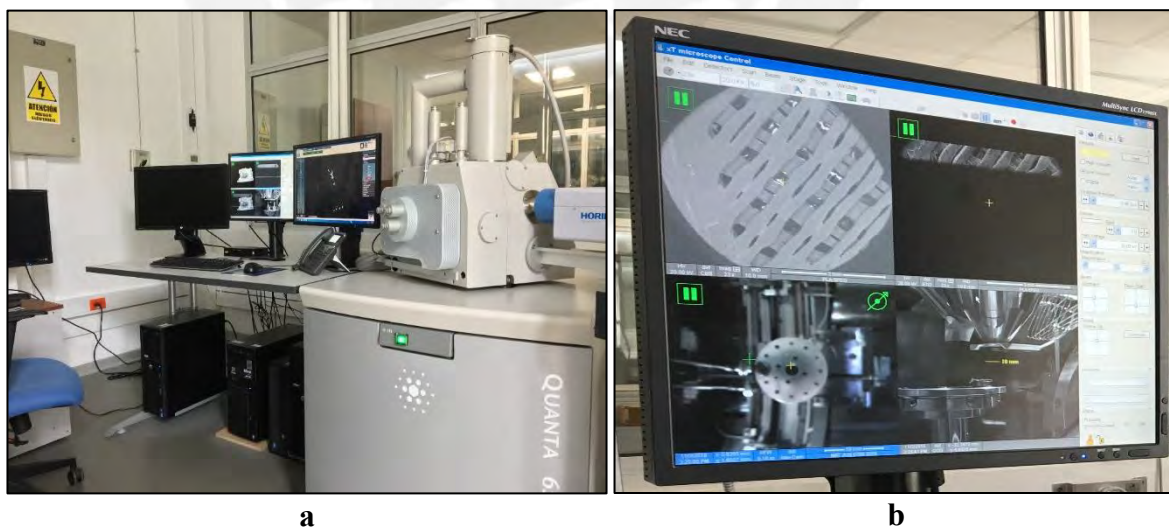
Figura 2. 11 a. Equipo DSC NETZSCH STA 449 F1 Júpiter®. b. Programa de temperatura usado para la determinación de resultados en el DSC



### 2.3.5. Microscopía electrónica de barrido

Se busca observar la morfología de la superficie en la matriz polimérica, luego de la impresión, después de la adhesión de ácido úsnico a su superficie y de quitosano como película, luego de la degradación hidrolítica y de la liberación controlada, se usó para ello de un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 650 (Figura 2.12 a), el cual cuenta con una capacidad de hasta 300000 aumentos además de realizar un microanálisis químico para estimar su composición mediante la técnica de espectrometría por dispersión de rayos X (EDS).

Se cubrirán las matrices poliméricas antes de su observación, con una microcapa de oro, para hacer conductora la superficie y poder observar su morfología a bajo vacío. Las muestras serán colocadas en tamaños de 5 mm de lado aproximadamente en la porta muestra del microscopio y variando la distancia entre el detector y la portamuestra para la obtención de una imagen de adecuada resolución (Figura 2.12 b).



*Figura 2.12.a. Equipo SEM FEI Quanta 650 del laboratorio de investigación de la PUCP. b. Obtención de las imágenes mostrando el proceso de las mismas.*

### 2.3.6. Degradación hidrolítica / mineralización

Se usó la norma ASTM F1980 – 07 “*Standard Guide for Accelerated Aging of Sterile Barrier Systems for Medical Devices*” [61], la degradación hidrolítica nos dará una idea de cómo se comporta la matriz polimérica en un medio acuoso, en este caso, un fluido con las concentraciones similares de sales que un fluido corporal, para lo cual se pesó las muestras iniciales y se sumergió en el líquido, por intervalos de tiempo controlados, para ir luego controlando las variaciones de peso y su mineralización esperando que se forme una capa de óxidos de calcio y sodio en sus superficie.

### 2.3.7. Degradación hidrolítica acelerada

La degradación hidrolítica puede darse de un modo acelerado según investigaciones dadas [62], para lo cual se preparará una solución con una concentración molar 0.1 M de hidróxido de sodio (NaOH), en la cual se colocarán las piezas impresas de 5cm x 5cm x 2cm, a  $37 \pm 2$  °C, pesando las muestras cada 8 horas luego de haberlas secado por 12 horas a 40 °C.

### 2.3.8. Porosidad

El porcentaje teórico de porosidad de volumen (% volumen teórico) Se calculó para la geometría de cada andamio usando el diseño de la pieza inicial, para lo cual se tuvo los siguientes parámetros en la ecuación 3

$$\% \text{ volumen teórico} = \left( 1 - \left( \frac{\varnothing^2}{4} \right) * \pi * Nc * \frac{Nl}{wh} \right) * 100 \dots \dots \dots (\text{Ecuación 3}) [63]$$

Donde  $\varnothing$  es el diámetro del filamento,  $w$  el ancho y  $h$  el alto de la pieza impresa,  $Nc$  representa el número de filamentos por capa y  $Nl$  el número de capas por andamio, representados estos parámetros en la figura 2.13.

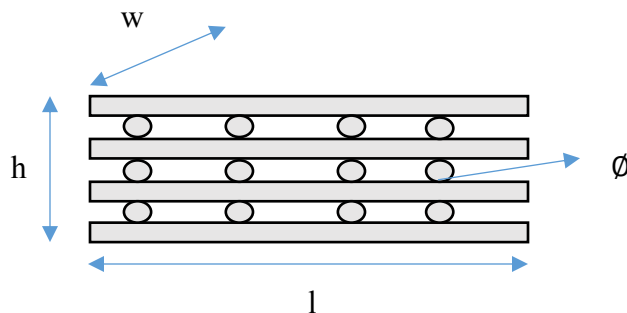


Figura 2.13. Esquema para la determinación de la porosidad experimental de las matrices porosas.

Se comparará este resultado con el porcentaje experimental de porosidad  $\rho_{experimental}$ , dado por la ecuación 4.

$$\rho_{experimental} = \left(1 - \frac{\rho_{matriz\ polimérica}}{\rho_{PLA}}\right) * 100 \dots \dots \dots (Ecuación 4) [64]$$

Donde la densidad teórica del PLA ( $\rho_{PLA}$ ) es de 1.24 g/cm<sup>3</sup> (Tabla 2.1), con estos valores se buscará estimar y comparar la porosidad tanto experimental como teórica de las matrices obtenidas mediante la impresión.

### 2.3.9. Microscopía UV visible

Se desarrollaron los experimentos de liberación controlada, según procedimientos descritos en referencias mencionadas [65], para lo cual se usará un equipo **Lambda** de doble haz mostrado en la figura 2.14, que contiene una lámpara de tungsteno para la corrección del a señal y un rango de barrido de 0 a 200 cm<sup>-1</sup> de longitud de onda, obteniendo los resultados cuantificando la absorbancia que se dé mediante el paso del haz de luz sobre la muestra analizada.



Figura 2.14. Espectrofotómetro Lambda de doble haz de luz

En el equipo UV del laboratorio de microanálisis de la PUCP, usa un sistema de doble Haz para poder determinar la cantidad de absorbancia que se produce conforme pasa una muestra por las celdas de cuarzo puestas en los contenedores de luz, este equipo cuenta con dos compartimientos para las celdas que permite medir simultáneamente la cantidad de energía absorbida por la sustancia sin ningún analito llamada blanco, y la energía absorbida por la

muestra compuesta por el medio y la especie de interés, pasando por un monocromador con una lámpara de deuterio que hace que la radiación emitida sea constante y de un adecuado valor, para la adecuada lectura de la señales de absorbancia, debiendo calentarse esta media hora antes de su uso aproximadamente (Figura 2.15)

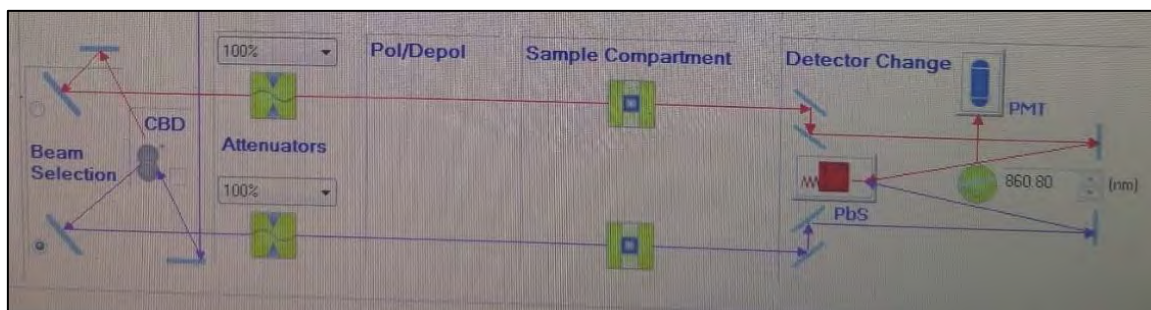


Figura 2.15. Funcionamiento del equipo UV donde los dos haces de luz miden tanto la luz directa como la luz absorbida por el material

## 2.4. Procedimiento experimental

Se obtuvo los filamentos en la empresa de extrusión VICCO S.A. donde se pudo mezclar el PLA con PEG al 0%, 5% y 10 % en peso para obtener 1 Kg de cada filamento, este se caracterizó en la PUCP mediante espectrometría FTIR para ver su estructura química, DSC para evaluar su cristalinidad, TGA para hallar su temperatura de degradación y como se degradan las mezclas conforme el porcentaje de PEG en ellas va aumentando, degradación que también será evaluada en una solución denominada fluido corporal simulado (SBF), por contener concentraciones de sales similares al del fluido vivo, además de evaluarse su degradación acelerada en una solución alcalina de hidróxido de sodio al 1%, y estimar el efecto del PEG en la misma, se determinará además el procedimiento para la adhesión del ácido úsnico a su superficie, así como de quitosano en forma de película sobre la misma, para evaluar su liberación controlada en un buffer salino que mantendrá el pH a un valor de  $7 \pm 0.5$  a una temperatura de  $37 \pm 0.2$  °C, bajo agitación constante.

### 2.4.1. Obtención de filamentos

Para la obtención de los filamentos usados para la impresión 3D, se usó la extrusora de doble husillo industrial de la empresa VICCO S.A., el material a extruir fueron pellets de ácido poliláctico (PLA) puro y polietilenglicol (PEG) en proporciones en peso de 5% y 10%, los cuales produjeron filamentos de un diámetro adecuado para la impresión entre  $1.75 \pm 0.5$ , teniendo un problema con las secciones donde el espesor no fue constante, ya que la

impresora tenía una limitación cuando se procedía a imprimir si el espesor no estaba en ese rango imprimir (Figura 2.15), las mezclas con las diferentes cargas de PEG se tuvieron que acondicionar antes de poder ingresar a la extrusora en una maquina especial para el mezclado, en la cual por 10 minutos los materiales tanto el PLA como el PEG formaron una mezcla homogénea, en la cual se notó que el PLA en forma de pellets y el PEG no se mezclaron bien, la formación de grumos debido a una temperatura elevada en el mezclado, así como la falta de adherencia entre ambas, problemas que se pudo haber corregido con la adición de algún solvente o aceite, el cual no usamos en este trabajo. (Figura 2.17).



*Figura 2.16. Mezclado de pellets de PLA y PEG.*



*Figura 2.17. Obtención de filamentos mostrando la sección transversal del mismo.*

En la extrusora de doble husillo LAB TECHT de la empresa VICCO S.A., se obtuvieron los filamentos de PLA y del material compuesto PLA/PEG al 5% y 10% en peso de PEG, usando las variables de la tabla 2.4. Esta extrusora tuvo cuatro zonas de calentamiento que ayudan a manejar varios perfiles de temperatura, ya que entre la zona de alimentación hasta la zona de fusión del polímero, se debe tener diferentes temperaturas que se reportan en la tabla N°10.

Una vez que el filamento sale caliente del extrusor, se colocará en un baño de agua con unos rodillos móviles, los cuales ayudarán a mantener la forma y el diámetro constante de los filamentos obtenidos.

**Tabla 2.4.** Parámetros de la extrusora

|  |                   |
|--|-------------------|
|  | 215 (Boquilla)    |
| Temperatura de calentamiento por zonas<br>(°C) | 220 (Tornillo)    |
|  | 190 (Tornillo)    |
|  | 60 (Alimentación) |
| Velocidad de estiramiento                      | 13.5 m/min        |
| Temperatura del baño de agua                   | 30 – 40°C         |

Los filamentos obtenidos deberán tener un diámetro entre 1.75+/- 0.2 mm, aparte de una apariencia constante libre de burbujas, poros e irregularidades, estos se muestran en la tabla 2.5.

**Tabla 2.5.** Filamentos obtenidos de PLA/PEG con diferentes porcentajes

| Filamento   | Apariencia   | Cantidad |
|-------------|--|----------|
| PLA         |  | 1 Kg     |
| PLA/PEG 5%  |  | 1 Kg     |
| PLA/PEG 10% |  | 1 Kg     |

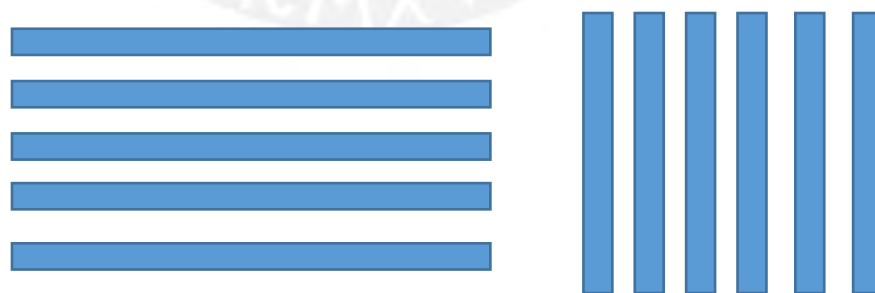
## 2.4.2. Obtención de matrices porosas

En el proceso de impresión mediante adición de material fundido (AFM), se usaron para el desarrollo de la tesis filamentos comerciales de PLA, filamentos obtenidos de PLA/PEG al 5% y 10% en peso, en una impresora MakerBoot 3D del laboratorio 4 de la facultad de ingeniería mecánica de la PUCP, en el cual en el programa simplify del mismo, se desarrollaron las matrices, se notó cierta dificultad al imprimir ya que al no tener una sección constante por tramos, los filamentos se atoraban, pero se corrigió el problema con el sistema de extrusión que tiene la impresora del laboratorio, se usó una boquilla con un diámetro de 0.4 mm, siendo los parámetros de impresión descritos en la tabla 2.6.

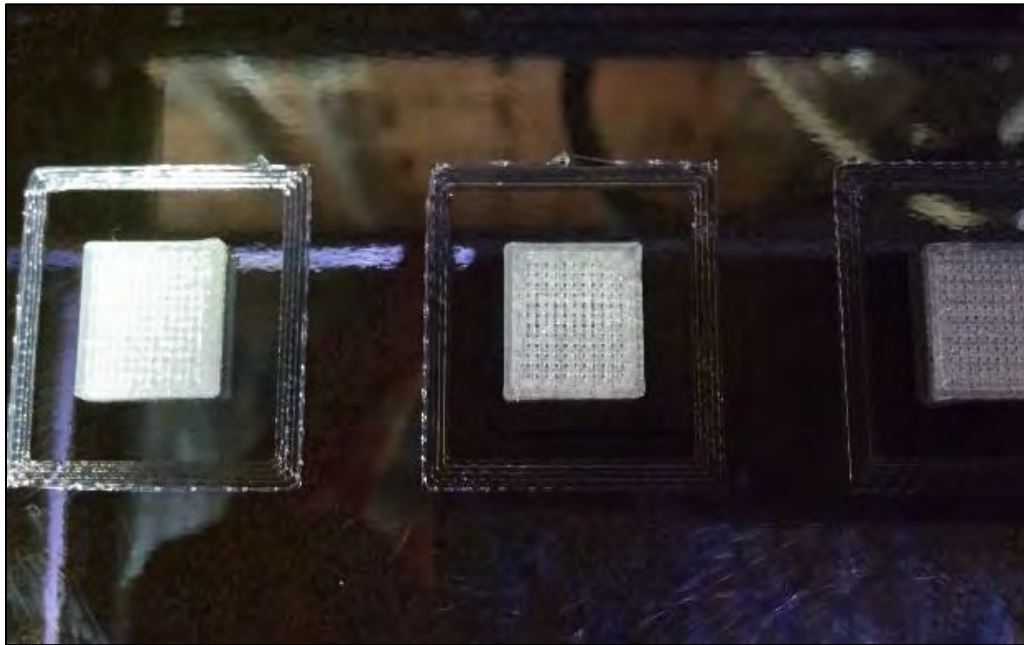
**Tabla 2.6.** Parámetros de impresión

|   |               |
|---|---------------|
| Temperatura de la boquilla (°C)         | 210- 200- 190 |
| Velocidad de impresión (mm/min)         | 4800          |
| Temperatura de la cama o soporte (°C)   | 60            |
| Espesor de la capa (mm)                 | 0.2           |
| Porcentaje de relleno ( <i>Infill</i> ) | 50%-80%       |
| Dirección de impresión (°)              | 0-90°         |

Se imprimieron piezas cilíndricas y piezas rectangulares con una geometría de 45-45, eso quiere decir que cada vez que el extrusor dibujaba una capa sobre la otra, esta se sobreponía un ángulo de 90° con respecto a la anterior (Figura 2.18), observándose el desarrollo final de estructura en la figura 2.19.



*Figura 2.18. Disposición geométrica en el proceso de impresión, dándose esta repetición capa por capa*



*Figura 2.19. Proceso de impresión de Matrices poliméricas porosas en la impresora MakerBoot 2X.*

#### **2.4.2. Degradación hidrolítica**

Se preparó el medio acuoso donde se llevará a cabo la degradación, denominado fluido corporal simulado (SBF), el cual tiene la composición iónica expuesta en la tabla 2.7

**Tabla 2.7.** Composición química del fluido corporal

| Ión                            | Plasma sanguíneo (mM) | SBF (mM) |
|--------------------------------|-----------------------|----------|
| Na <sup>+</sup>                | 142.0                 | 142.0    |
| K <sup>+</sup>                 | 5.0                   | 5.0      |
| Mg <sup>+</sup>                | 1.5                   | 1.5      |
| Ca <sup>+</sup>                | 2.5                   | 2.5      |
| Cl <sup>-</sup>                | 103.0                 | 147.8    |
| HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>  | 27.0                  | 4.2      |
| HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | 1.0                   | 1.0      |
| SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>  | 0.5                   | 0.5      |
| pH                             | 7.0                   | 7.0      |



Para la preparación se midió 300 mL de agua destilada a 40°C y en agitación constante, a la cual se fue agregando uno a uno los reactivos en el orden puesto en la tabla 2.8, cuando la solución se homogenizó, se agregó una cantidad suficiente de ácido clorhídrico 1 N, hasta obtener un pH cercano a 7.0, luego se enrrasa a 1 litro en una fiola aforada, manteniendo la solución a 25 °C sin exponerse al sol por un máximo de 2 semanas. Los reactivos que se usarán en la preparación de 1 litro de solución a un pH  $\approx 7.2 \pm 0.5$  a 25 °C se presentan en la tabla 2.8.

**Tabla 2.8.** Reactivos usados en la preparación de SBF.

| Reactivo  | Cantidad $\pm 0.0005$ (g) ó $\pm 0.05$ (mL) |
|---|---|
| Cloruro de sodio (NaCl)   | 8.0360 g                                    |
| Cloruro de potasio (KCl)  | 0.2250 g                                    |
| Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)        | 0.3110 g                                    |
| Cloruro de calcio anhidro (CaCl <sub>2</sub> )                                  | 0.2930 g                                    |
| Ácido clorhídrico (HCL, 1N)   | 40 mL                                       |
| Carbonato ácido de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )                                  | 0.3520 g                                    |
| Fosfato ácido de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )                     | 0.2280 g                                    |
| Sulfato de sodio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )                             | 0.0720 g                                    |
| Tris(hidroximetil)aminometano (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> N) | 6.0630 g                                    |

Otro de las razones para usar el SBF fue con el objetivo de modificar la superficie polimérica y buscar la formación de capas de fosfato de calcio (apatita) en el polímero, para promover la formación de hidroxiapatita, además se evaluó en el tiempo la pérdida de peso de los materiales y estudiar su degradación hidrolítica en relación al porcentaje de PLA/PEG presente en el *scaffold*.

En la tabla 2.9, se muestran los pesos experimentales que se usaron para las preparaciones dadas.

**Tabla 2.9.** Pesos experimentales para la obtención de SBF

| Reactivo   | Cantidad $\pm 0.0005$ (g) ó $\pm 0.05$ (mL) |                |                |
|--|---|----------------|----------------|
|  | 1° preparación                              | 2° preparación | 3° preparación |
| Cloruro de sodio (NaCl)                                    | 8.0381 g                                    | 8.0481 g       | 8.0406 g       |
| Cloruro de potasio (KCl)                                   | 0.2249 g                                    | 0.2249 g       | 0.2365 g       |
| Cloruro de magnesio hexahidratado ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) | 0.3170 g                                    | 0.3176 g       | 0.3212 g       |
| Cloruro de calcio anhidro ( $CaCl_2$ )                     | 0.2937 g                                    | 0.3011 g       | 0.2947 g       |
| Ácido clorhídrico (HCL, 1N)                                | 41 mL                                       | 39.5 mL        | 42 mL          |
| Carbonato ácido de sodio ( $NaHCO_3$ )                     | 0.3592 g                                    | 0.3554 g       | 0.3600 g       |
| Fosfato ácido de potasio ( $K_2HPO_4$ )                    | 0.2550 g                                    | 0.2487 g       | 0.2328 g       |
| Sulfato de sodio ( $Na_2SO_4$ )                            | 0.0934 g                                    | 0.0790 g       | 0.0703 g       |
| Tris(hidroxiometil)aminometano ( $C_4H_{11}O_5N$ )         | 6.0694 g                                    | 6.0605 g       | 6.0722 g       |

Una vez obtenido el SBF, e impresas las matrices porosas de 5cm x 5cm x 2cm de PLA puro, al 5% y 10% de PEG en peso, se adicionó 5 mL de SBF y se mantuvo a una temperatura de  $37 \pm 2^\circ C$  por 1 semana (Figura 2.20), luego del cual, se retiró el líquido y se enjuagaron las muestras con agua destilada y alcohol etílico, se secaron a  $37 \pm 2^\circ C$  por espacio de 24 horas, se pesó y se agregó 5 mL de SBF para volver a degradar por espacio de 1 semana. Se tomaron imágenes SEM a 2 meses de inmersión en el SBF para su comparación.



*Figura 2.20. Ensayos de degradación en fluido corporal simulado (SBF)*

### **2.4.3. Degradación hidrolítica acelerada**

Se preparó una solución 0.1 M de hidróxido de sodio (NaOH), para lo cual se pesó 4 g de NaOH y se agitó hasta disolver completamente para luego enrasar a 1 litro de solución en una fiola aforada, las piezas impresas de 5cm x 5cm x 2cm, a  $37 \pm 2$  °C, pesando las muestras cada 8 horas luego de haberlas secado por 12 horas a 40 °C.

### **2.4.4. Aditivación de la matriz polimérica con ácido úsnico**

Se imprimieron discos poliméricos como matrices porosas con una geometría que va entre  $6.25 \pm 0.5$  cm de diámetro con  $2.0 \pm 0.5$  mm de espesor (Figura 2.21 a), con porcentajes de *infill* o relleno de 50, 60, 70 y 80%; a los cuales se les cargará con ácido úsnico (AU) al 1% en peso, el AU, es soluble en cloroformo y acetona, pero se dispersa de buena forma en alcohol etílico o etanol, siendo completamente insoluble en agua, se usó etanol como medio de impregnación, debido a que tanto el cloroformo como la acetona disuelven al PLA y PEG, mientras el etanol no, el procedimiento desarrollado fue lavar las matrices poliméricas con agua destilada, y enjuagar 2 veces con alcohol etílico, secar las piezas en el horno a 40°C por 24 horas, pesar y calcular el peso de fármaco a usar para poder adicionar un 1% en peso de AU a cada pieza polimérica, los pesos se detallan en la tabla 2.10.

Una vez determinado el peso, en un vaso de precipitado de 50 mL se vierte 20 mL de etanol absoluto y el fármaco (Figura 2.21 b), se agita por espacio de 30 min hasta que el fármaco este bien disperso, una vez hecho esto se coloca en la solución el disco impreso, dejando que se impregne por espacio de 1 hora, se retira el disco polímero y se coloca sobre una caja Petri en una plancha de calentamiento, se adiciona gota a gota la solución alcohólica a 40°C, mientras el etanol se va evaporando, el fármaco se va adhiriendo a la superficie distribuyéndose por toda la matriz polimérica, se seca a 40°C en el horno por 24 horas y se pesa (Figura 2.21 c).

**Tabla 2.10.** Pesos teóricos y experimentales de la aditivación de ácido úsnico a las matrices poliméricas

| Relleno o <i>infill</i> | Peso inicial de la matriz polimérica ( $\pm 0.005$ ) | Peso final después de la adición de AU ( $\pm 0.005$ ) | Porcentaje de fármaco cargado |
|-------------------------|--|--|-------------------------------|
| PLA                     |  |  |                               |
| 50%                     | 0.8290   | 0.8374   | 1.00                          |
| 60%                     | 0.8349   | 0.8452   | 1.21                          |
| 70%                     | 1.1807   | 1.2003   | 1.63                          |
| 80%                     | 1.2750   | 1.2887   | 1.06                          |
| PLA/PEG 5%              |  |  |                               |
| 50%                     | 0.9950   | 1.0061   | 1.10                          |
| 60%                     | 1.0602   | 1.0707   | 0.98                          |
| 70%                     | 1.1816   | 1.1933   | 0.98                          |
| 80%                     | 1.4227   | 1.4379   | 1.06                          |
| PLA/PEG 10%             |  |  |                               |
| 50%                     | 0.6901   | 0.6369   | 1.08                          |
| 60%                     | 0.8006   | 0.7703   | 1.04                          |
| 70%                     | 1.0072   | 0.9173   | 1.09                          |
| 80%                     | 1.0262   | 1.0404   | 0.98                          |

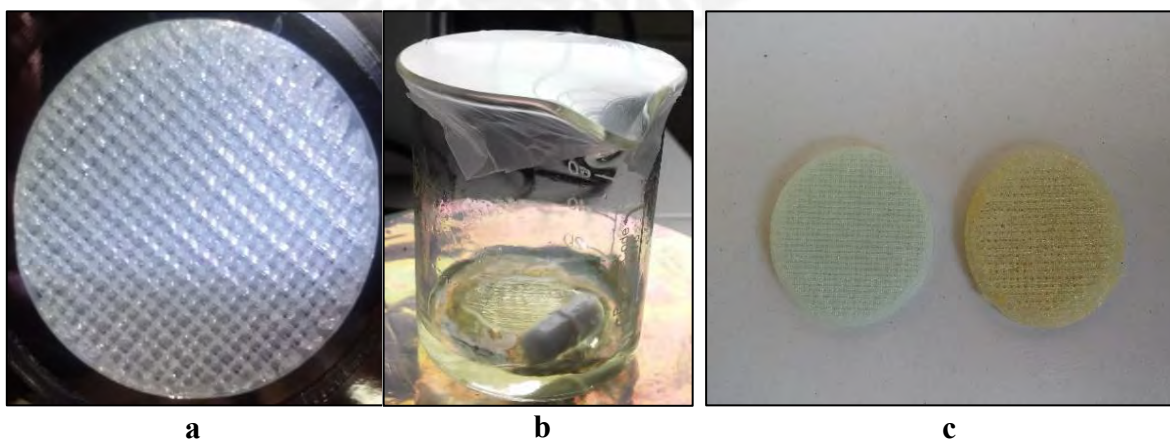


Figura 2.21. Funcionalización del armazón polimérico (Scaffold) con el ácido úsnico (AU)

Para la funcionalización con quitosano, este se disolvió en una solución al 5% en volumen de ácido acético, luego se colocó la pieza cargada de fármaco en la solución por unos minutos, y se colocó en una caja Petri para ser secado por 24 horas a 40°C en la estufa del laboratorio.

#### 2.4.5. Ensayos de liberación controlada

Una vez obtenidos las matrices poliméricas porosas cargadas de AU, se preparará el medio para poder tener la liberación controlada del mismo, el medio será una solución buffer de fosfatos de sodio y potasio denominada fosfato buffer salino (PBS), esta solución tiene la propiedad de mantenerse a un pH determinado (en nuestro caso  $7.0 \pm 0.5$ ) por tiempos prolongados. En la tabla 2.11 se detalla los pesos y cantidades usadas para la preparación de 1 litro de PBS.

**Tabla 2.11.** Pesos experimentales de los reactivos para la preparación de PBS

| Reactivo   | Peso teórico<br>(g) | Peso experimental $\pm 0.0005$ (g) |        |        |        |        |
|--|---------------------|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
|  |                     | Sol. 1                             | Sol. 2 | Sol. 3 | Sol. 4 | Sol. 5 |
| Cloruro de sodio (NaCl)                          | 8.06                | 8.0597                             | 8.0678 | 8.0674 | 8.0680 | 8.0645 |
| Cloruro de potasio (KCl)                         | 0.22                | 0.2298                             | 0.2281 | 0.2192 | 0.2214 | 0.2202 |
| Bifosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) | 1.15                | 1.1542                             | 1.1805 | 1.1567 | 1.1569 | 1.1549 |
| Fosfato de potasio ( $\text{KHPO}_4$ )           | 0.20                | 0.2108                             | 0.2182 | 0.2051 | 0.2017 | 0.1997 |

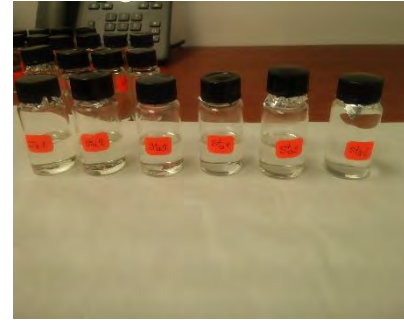
Para el proceso de liberación controlada de fármaco, se agito a 200 rpm 150 mL de PBS, a  $37 \pm 2$  °C, una vez llegado a esa temperatura se agrega la pieza polimérica cargada con AU, se controla que el pH este a  $7.0 \pm 0.5$ , cada hora se retirará 10 mL de solución y se extraerá el fármaco en una pera de decantación, agregando 2 mL de cloroformo y separándolo usando sulfato de sodio para eliminar trazas de agua que puedan estar presentes, este líquido se llevará a un volumen conocido con cloroformo en una fiola de 25 mL, para su posterior análisis de absorbancia en un equipo UV (Figura 2.22).



**a**



**b**



**c**

*Figura 2.22.a. PBS agitando con el scaffold mientras se va liberando el fármaco; b. Separación del fármaco de la fase acuosa con cloroformo; c. Muestras preparadas para lectura UV*



## **CAPÍTULO III**

### **RESULTADOS Y ANÁLISIS**

En este capítulo, se presentarán los resultados de la caracterización de los filamentos y aditivos, así como los resultados del estudio de las matrices porosas y su degradación hidrolítica y acelerada. Se concluye este capítulo con las curvas de liberación controlada como resultado de la evaluación de las matrices porosas aditivadas con ácido úsnico y quitosano en función de la concentración de una solución tampón salina en el tiempo.

### 3.1. Caracterización de los filamentos y aditivos

#### 3.1.1. Ensayos de fluidez

Se utilizaron granzas de las diferentes mezclas poliméricas, para obtenerlas se cortaron los filamentos a un tamaño aproximado de 2 a 3mm. La configuración del equipo empleado para el ensayo con PLA comprende la utilización de una masa de 2,16 kg como peso para empujar los filamentos al fluir, y temperaturas que varía desde los 170°C a 190°C para las mezclas poliméricas con PEG al 5 y 10% en peso. La comparación se dará para obtener un aproximado de cuanto material se deposita en la impresión conforme se obtiene la matriz polimérica. Los resultados de los ensayos se muestran en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Resumen de los valores obtenidos de índice de fluidez de las matrices poliméricas porosas.

| <b>Temperatura</b>        | <b>190</b>  | <b>180</b>  | <b>170</b>  |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Matriz                    | PLA         | 5%PEG       | 10%PEG      |
| Valores (g/min)           | 0.9156      | 1.8828      | 2.4096      |
|                           | 0.8742      | 1.5702      | 2.3988      |
|                           | 0.7572      | 1.572       | 2.2998      |
|                           | 0.7344      | 1.7574      | 2.3772      |
|                           | 0.8982      | 1.5774      | 2.511       |
| <b>Promedio</b>           | <b>0.84</b> | <b>1.67</b> | <b>2.40</b> |
| <b>Desviación</b>         | <b>0.08</b> | <b>0.14</b> | <b>0.08</b> |
| <b>Promedio (g/10min)</b> | <b>8.4</b>  | <b>16.7</b> | <b>24.8</b> |

En la tabla 3.1 se muestra el efecto que tiene en la matriz el plastificante de PEG en el índice de fluidez. Si bien no se mantuvo la temperatura constante debido a que para los porcentajes de 5% y 10% de PEG, a 190°C, la fluidez de ambos era demasiada alta por la presencia del PEG, dificultando su análisis, estos valores se tomarán como adecuados y comparables para el momento de la impresión. Por la razón anterior, las temperaturas de impresión de los 3 filamentos también se diferencian en 10° (210°C, 200°C y 190°C para los filamentos de PLA, PLA/PEG 5% y PLA/PEG 10% respectivamente).

Según los resultados del índice de fluidez se evidencia que, conforme aumentan el porcentaje de PEG en los filamentos, su índice de fluidez aumenta considerablemente, duplicándose



(16.7 g/10min) para el PLA/PEG 5%, y triplicándose (24.8 g/10min) cuando se trata del PLA/PEG 10% en comparación con el valor obtenido de PLA puro; mostrando que el PLA es plastificado por el PEG [63]. Según la desviación estándar obtenida en las matrices poliméricas porosas, que es relativamente bajo, se puede asumir que la fluidez promedio de los filamentos es constante a lo largo del mismo.

### 3.1.2. Ensayos de FTIR del PLA y PEG.

Por un lado, el espectro del PLA (Figura 3.1 superior) contiene bandas de absorción características entre 2800 a 3000  $\text{cm}^{-1}$ , 1300-1500  $\text{cm}^{-1}$  y 866  $\text{cm}^{-1}$ , que pueden ser asignadas a los grupos metileno (estiramiento y vibraciones de deformación, respectivamente). Además, presenta una banda fuerte y aguda a 1750  $\text{cm}^{-1}$  debido al grupo C=O. Finalmente, la banda a 1182  $\text{cm}^{-1}$  se puede atribuir al grupo C-O-C.

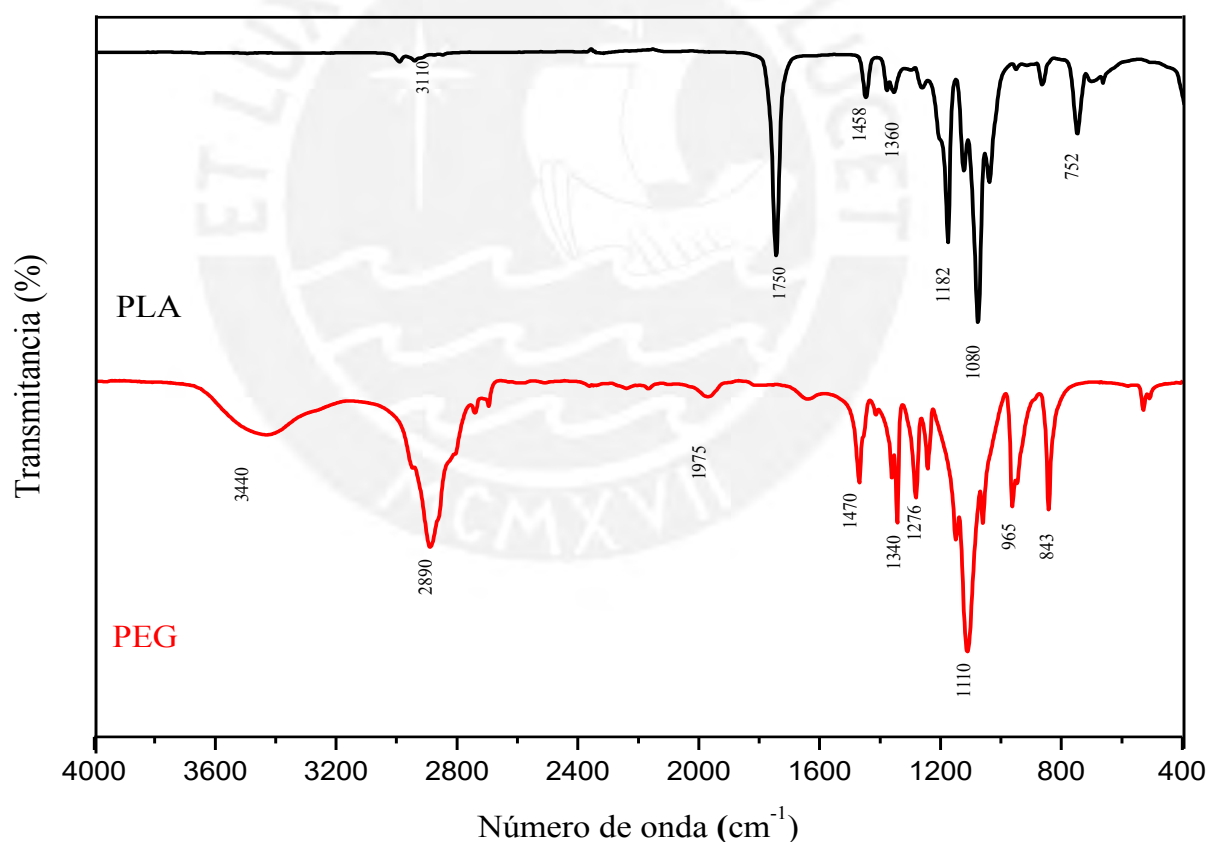


Figura 3.1. FTIR del PLA y PEG indicando las señales características de ambos

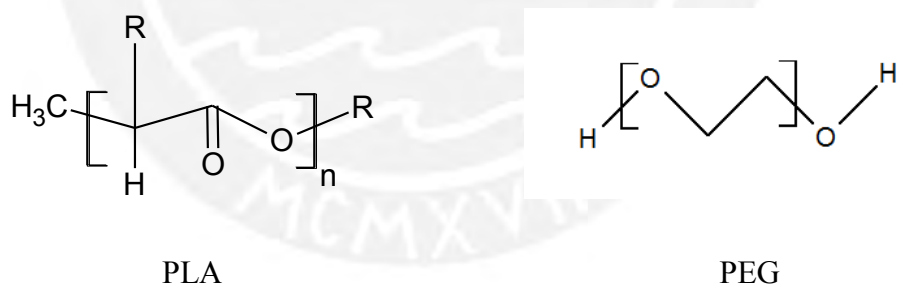
Por otro lado, el espectro del PEG (Figura 3.1 inferior) presenta una banda ancha no muy pronunciada a 3440  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde al grupo hidroxilo. Además, contiene bandas de

metileno a 2880, 1466, 1339, 957 y 838  $\text{cm}^{-1}$  (de estiramiento y deformación). Finalmente, la banda intensa a 1110  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al grupo éter.[66]

**Tabla 3.2.** Números de onda representativos con sus grupos funcionales

| Número de onda             | Estructura química |
|----------------------------|--------------------|
| PLA                        |                    |
| 1750                       | C=O                |
| 3110, 1458, 1360, 752      | C-H                |
| 1182                       | C-O-C              |
| PEG                        |                    |
| 3440                       | O-H                |
| 2890, 1470, 1340, 965, 843 | C-H                |
| 1226                       | O-H                |
| 1110                       | C-O-H              |

Por tanto, se puede deducir que las estructuras del PLA y del PEG son las mostradas en la figura 3.2



*Figura 3.2. Estructura química de PLA y PEG según sus grupos funcionales*

### 3.1.3. Ensayos TGA

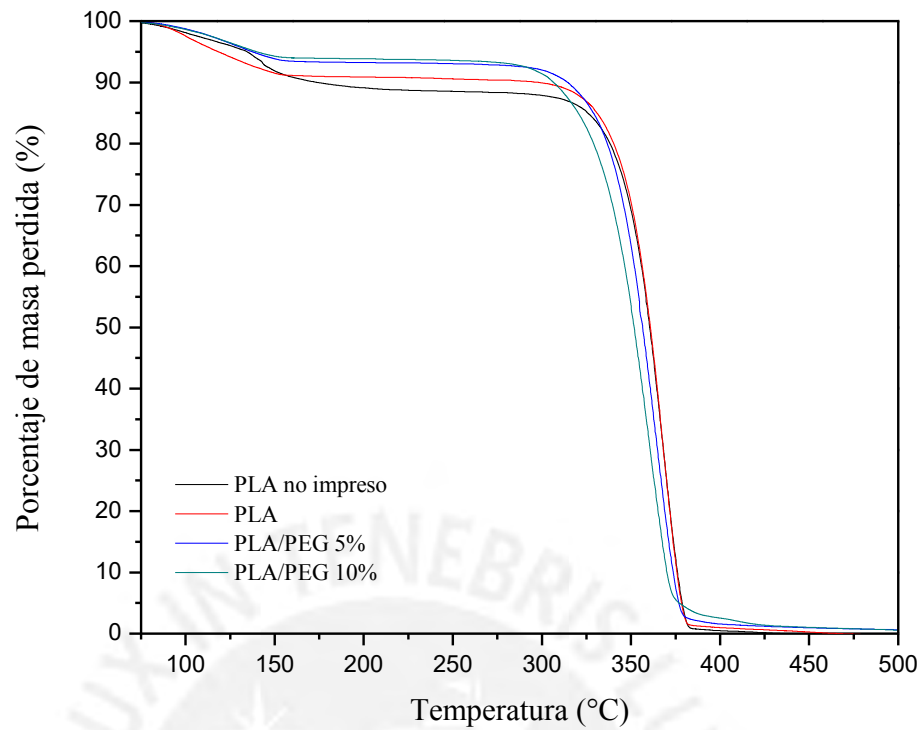
Las curvas termogravimétricas (TGA) proporcionan información sobre la naturaleza y extensión en el proceso de degradación de los materiales poliméricos. Los termogramas TGA de las mezclas de PLA/PEG se dan en la figura 3.3, la parte inferior es un acercamiento de la gráfica a la zona de degradación. En la tabla 3.3 se presenta una evaluación detallada de los termogramas, con valores de  $T_g$ , así como la temperatura de inicio de la descomposición

( $T_{\text{onset}}$ ), la temperatura máxima de degradación del 100% ( $T_{\text{end}}$ ) y la temperatura de descomposición del 50% del polímero ( $T_{50}$ )

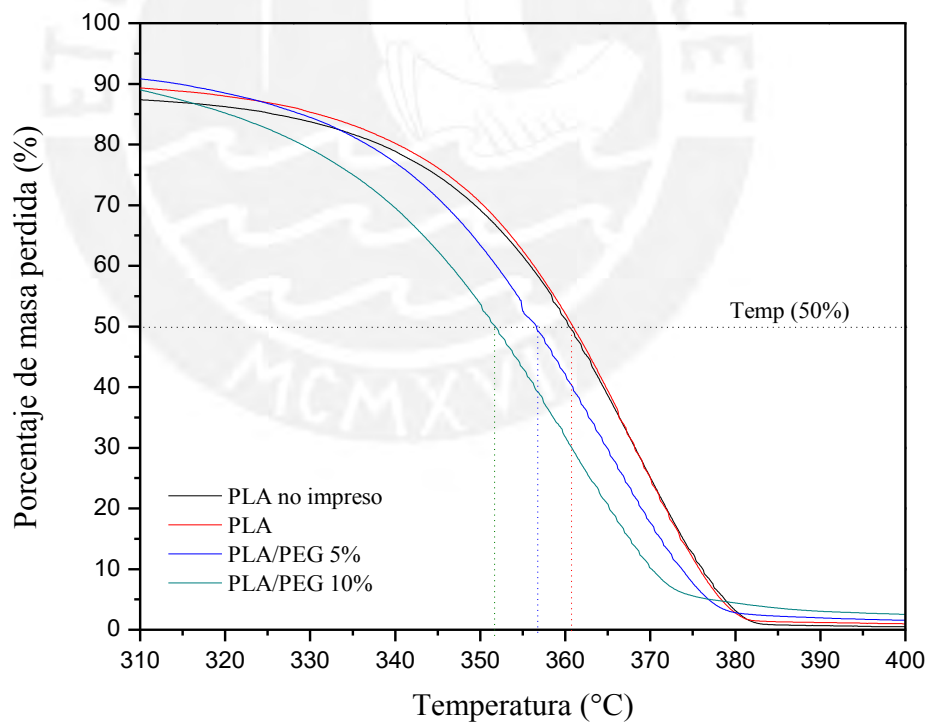
**Tabla 3.3.** Resumen de valores obtenidos en el ensayo TGA

| Material polimérico | $T_{\text{onset}}$ | $T_{\text{end}}$ | $T_{50}$ |
|---------------------|--------------------|------------------|----------|
| PLA no impreso      | 335.48             | 377.94           | 361.22   |
| PLA                 | 336.45             | 377.84           | 360.80   |
| PLA/PEG 5%          | 327.78             | 376.08           | 356.58   |
| PLA/PEG 10%         | 312.42             | 372.71           | 351.71   |

El procedimiento para obtener los valores de la tabla 3.3 se muestra en la figura 3.4. El desplazamiento gradual de estos valores a temperaturas más bajas ocurre cuando se añade el plastificante PEG. Este cambio se hace más notorio conforme la cantidad de PEG en la composición del filamento es más alta. Como ejemplo, se observa un cambio de 336.45 °C a 377.84 °C y de 312.42 °C a 372.21 °C, para la temperatura de inicio de descomposición y la temperatura de descomposición máxima de los filamentos de PLA y PLA/PEG 10%, respectivamente. La disminución de la estabilidad térmica del PLA se debe principalmente a la presencia de PEG como plastificante, ya que para descomponerse completamente el PLA requiere solo 41°C mientras que el PLA/PEG 10% requiere 60°C. El PEG promueve esta disminución por su acción plastificante [63], sus moléculas se intercalan alrededor del PLA rompiendo los enlaces polímero-polímero, con mayor facilidad.



**a**



**b**

Figura 3.3. **a.** Gráficas TGA, donde en la gráfica inferior **b.** se hace un acercamiento a la zona de degradación o pérdida de peso

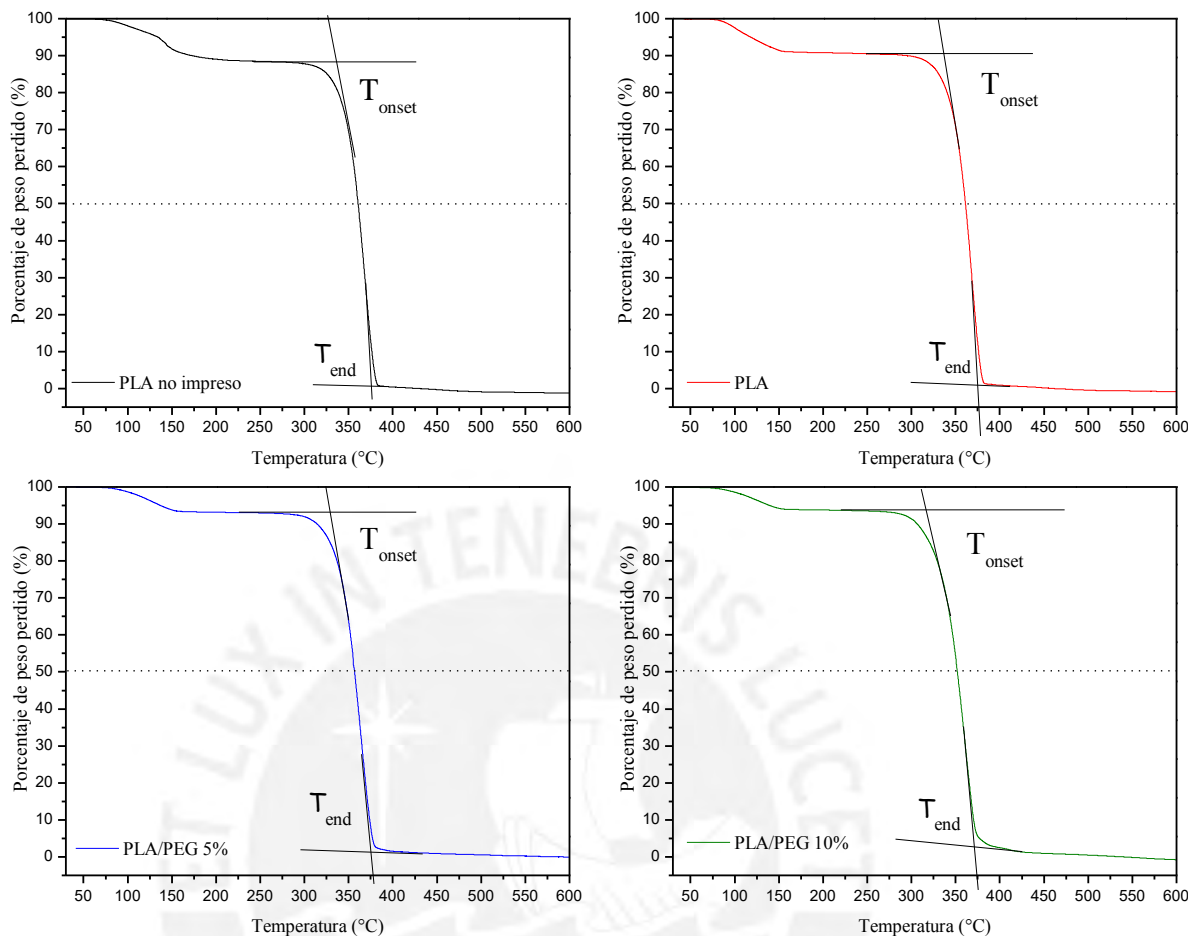


Figura 3.4. Termogramas de TGA para determinar la temperatura de inicio de degradación ( $T_{onset}$ ) y de final de degradación ( $T_{end}$ )

### 3.1.4. Ensayos de DSC

Los ensayos DSC miden la cantidad de energía térmica absorbida o liberada cuando el material se calienta o enfría de modo controlado. Para los materiales poliméricos, estos cambios son importantes para poder evaluar sus diferentes transiciones térmicas, los ensayos DSC son una técnica muy útil para estudiar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalización ( $T_c$ ) y temperatura de fusión  $T_m$ , así como las energías y entalpías que están generadas. Valores nominales para el PLA y el PEG, se muestran en la tabla 3.4.

**Tabla 3.4.** Valores nominales de la  $T_g$  y  $T_m$  para el PLA y PEG

| Materiales                   | Mn (g/mol) | $T_m$ (°C) | $T_g$ (°C) | Referencia |
|------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Ácido poliláctico PLA 4042 D | 66000      | 149.75     | 62.85      | [67]       |
| Polietilenglicol PEG         | 3350       | 65         | -41        | [9]        |

En la figura 3.5 se observa el movimiento de la Tg de las mezclas hacia la izquierda conforme va aumentando el porcentaje de PEG, este efecto evidencia que el PEG es un plastificante para el PLA, haciendo que baje su temperatura de Tg y, por tanto, este será un material más dúctil a temperaturas más elevadas que la Tg [68].

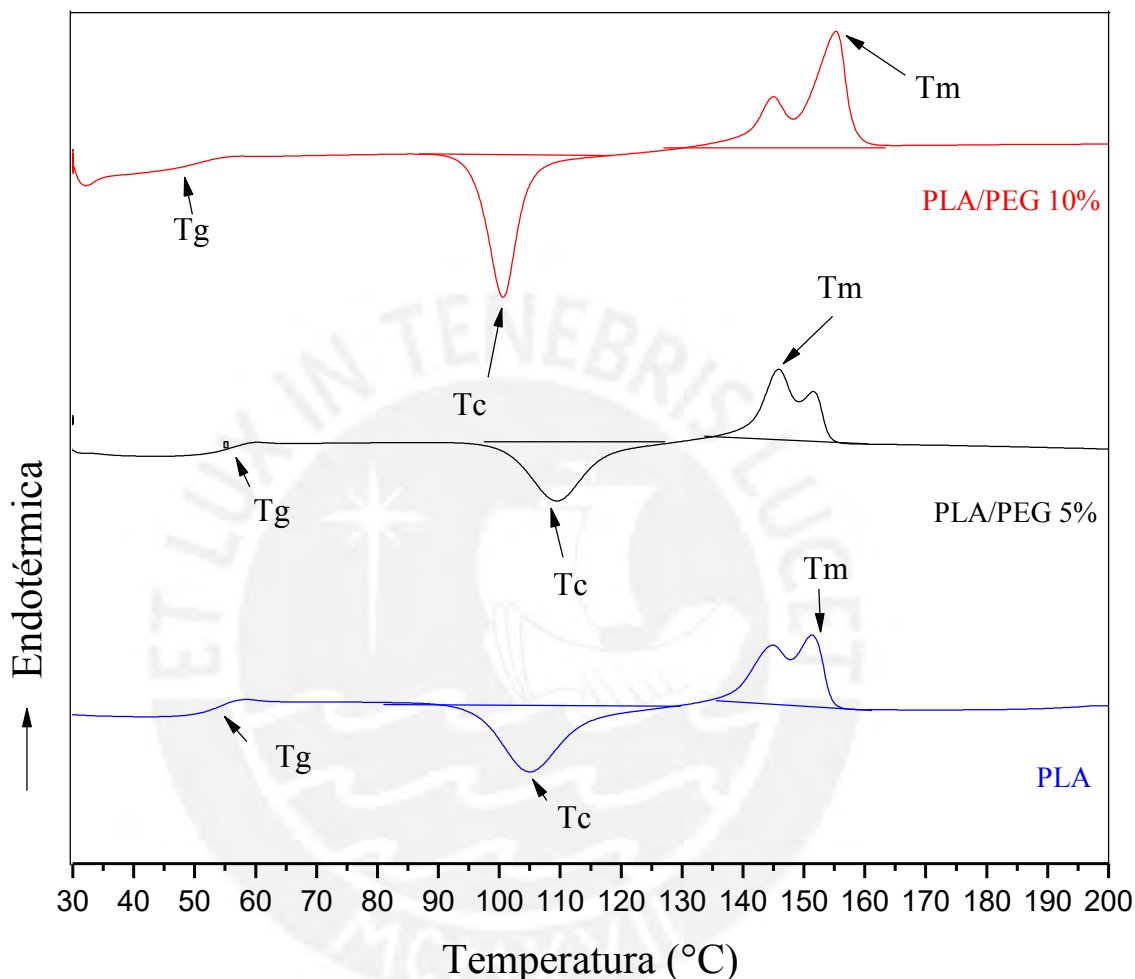


Figura 3.5. Gráficas DSC de las diferentes matrices poliméricas de PLA. PLA/PEG 5% y PLA/PEG 10%

Para poder hallar la cristalinidad de estos materiales compuestos, se usará la ecuación 5.

$$\text{Cristalinidad(\%)} = \left[ \frac{(\Delta H_m - \Delta H_{cc}) / \varphi_{\text{PLA}}}{\Delta H_m^{\circ}} \right] * 100 \dots \dots \dots (\text{Ecuación 5})$$

Donde  $\Delta H_m$  es el calor de fusión medido,  $\Delta H_{cc}$  es el calor de Cristalización en frío,  $\varphi_{\text{PLA}}$  es el contenido de PLA en la mezcla y  $\Delta H_m^{\circ}$  es la entalpía de fusión del 100% de PLA (93,6 J / g) [68].

**Tabla 3.5.** Valores obtenidos en el ensayo DSC

|             | Tg (°C) | Tc (°C) | Tm (°C) | $\Delta H_m$ (J/g) | $\Delta H_c$ (J/g) | Cristalinidad (%) |
|-------------|---------|---------|---------|--------------------|--------------------|-------------------|
| PLA         | 55      | 105.10  | 151.51  | 21.3554            | 21.2852            | 7.27              |
| PLA/PEG 5%  | 52      | 106.94  | 144.34  | 27.3096            | 25.0241            | 24.93             |
| PLA/PEG 10% | 41      | 96.50   | 152.45  | 26.6767            | 24.0854            | 29.83             |

La tabla 3.5 resume la temperatura de transición vítrea (Tg), la temperatura de cristalización (Tc) y de fusión (Tm) del PLA y PLA/PEG al 5% y 10%, actuando el PEG como un plastificante. El análisis de calentamiento de PLA, PLA/PEG 5% y PLA/PEG 10% mostró un pico exotérmico (fusión) en cada caso; sin embargo, no se notó una tendencia de algún aumento o disminución de la Tm, debido a la adición de PEG en las mezclas, indicando que la Tm del PLA no se vio afectada por la adición del PEG a estos porcentajes. El PLA puro mostró una Tg de 55°C; su valor disminuyó gradualmente con el incremento de PEG que actúa como plastificante, como se muestra en la tabla 3.5. Al 5% en peso de PEG, la Tg disminuyó 3°C con respecto al PLA puro y cuando se tiene un 10% de PEG en peso, esta disminución fue de 14°C.

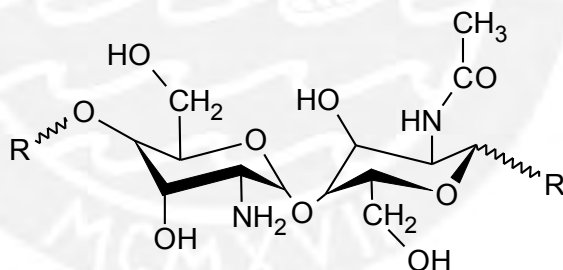
La temperatura de cristalización no se vio afectada cuando se adiciono un 5% de PEG al PLA, pero si se notó una disminución cuando el porcentaje de PEG fue de 10%, debido a que este polímero conduce a la nucleación de las esferulitas de un modo más rápido por el mayor porcentaje de PEG, dando como resultado un tiempo de cristalización más corto y posiblemente tamaños de esferulita más pequeños [69]. La disminución significativa tanto del Tc y Tg indicaron que el PEG era compatible con el PLA debido a la mayor movilidad de la cadena ya que el contenido de plastificante aumentó [70]. La movilidad de la cadena aumenta el porcentaje de cristalización, lo que permitió al PLA cristalizar a menor temperatura, notándose también que el pico de cristalización se estrechó a medida que el plastificante aumentaba su porcentaje, debido a la mayor capacidad de cristalización del PLA [71]. Cuando una molécula polimérica cristaliza, este alto grado de organización se convierte en un factor principal en sus propiedades de degradación. La cristalinidad de PLA (7.27%) aumento con el porcentaje de PEG, notándose más este efecto en el PLA/PEG 10%. Es evidente que estas bajas cristalinidades permiten la compatibilidad con el PEG como plastificante; por ello, cantidades mayores de PEG no deberían mezclarse con PLA porque disminuirían su capacidad de mezcla o compatibilidad.

### 3.1.5 Espectro FITR del quitosano.

Para determinar la estructura del quitosano de la figura 3.6, se estudió el espectro del quitosano de la figura 3.7, observándose las bandas de los grupos funcionales característicos de la molécula de quitosano. Se hace evidente la aparición de la banda del grupo amino a  $1640\text{ cm}^{-1}$  y se observa la definición en las bandas de los grupos OH a  $3270\text{ cm}^{-1}$  y NH a  $3254\text{ cm}^{-1}$ , debido al proceso de desacetilación al que fue sometido el quitosano. También se aprecian las bandas del grupo C-H a  $2880\text{ cm}^{-1}$ , grupo piranósico a  $1030\text{ cm}^{-1}$ , y grupo C-O-C a  $1014\text{ cm}^{-1}$  [56]. Estos valores se resumen en la tabla 3.6.

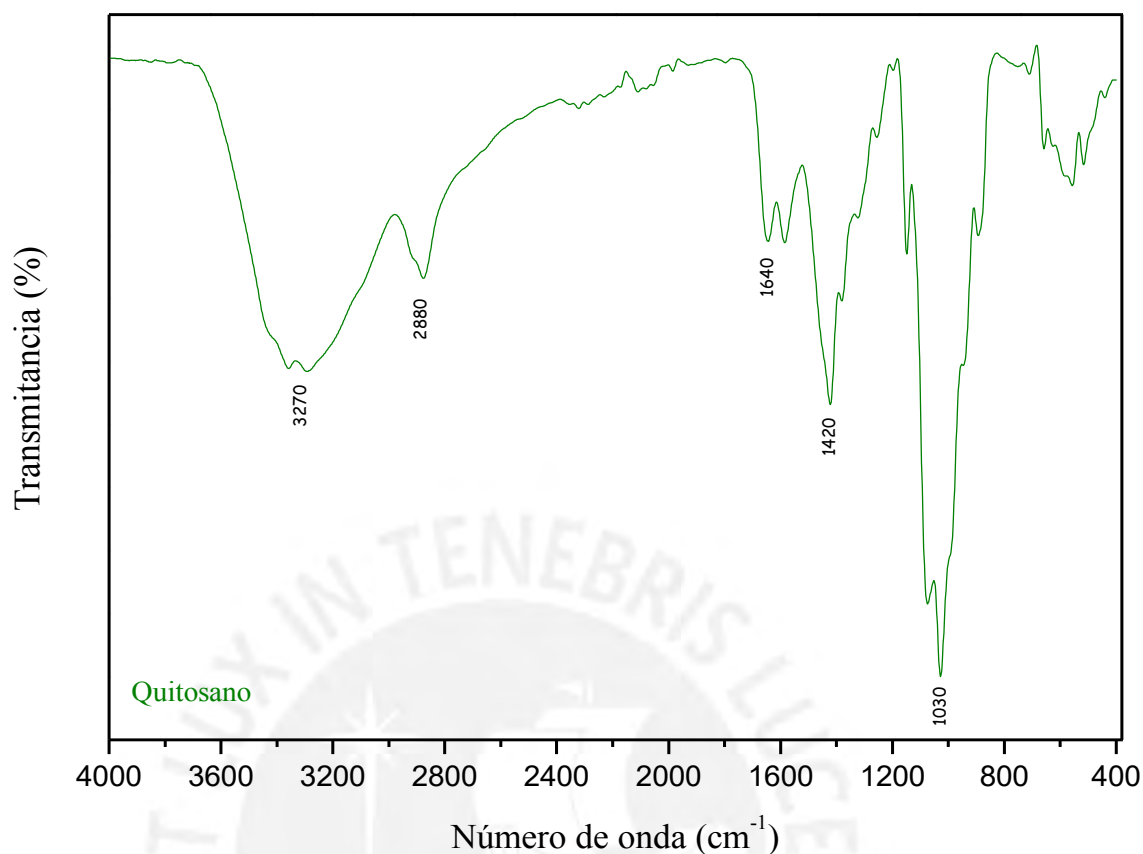
**Tabla 3.6.** Señales y grupos funcionales para el quitosano

| Número de onda | Estructura química |
|----------------|--------------------|
| Quitosano      |                    |
| 3270           | O-H, N-H           |
| 2880           | C-H                |
| 1643           | C-H, O-H, C-H      |
| 1030           | C-O-C              |



*Figura 3.6. Estructura química del quitosano*





*Figura 3.7. Espectro FTIR del quitosano*

### 3.1.6. Espectro FTIR del ácido úsnico.

En la figura 3.8 se observa el espectro FTIR del ácido úsnico. A  $1691 \text{ cm}^{-1}$  se observa un alargamiento del enlace  $\text{C}=\text{O}$ ; a  $1290 \text{ cm}^{-1}$  un alargamiento en el modo de vibración del  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  en el anillo aromático; a  $1632 \text{ cm}^{-1}$  para el grupo  $\text{C}=\text{C}$  conjugado, a  $3008 \text{ cm}^{-1}$  un alargamiento del  $\text{C}-\text{H}$  aromático y a  $3438 \text{ cm}^{-1}$  la presencia de grupos  $\text{OH}$  [40]. Como resultado, se tiene la estructura del ácido úsnico que se muestra en la figura 1.14.

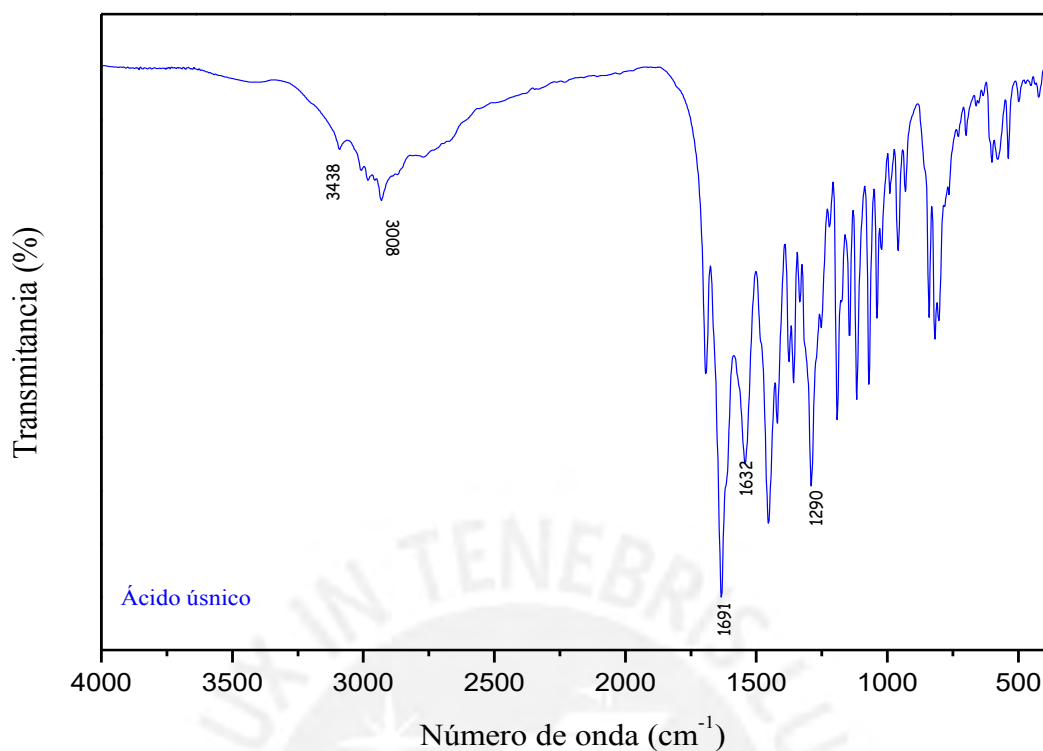


Figura 3.8. Espectro FTIR del ácido úsnico

### 3.1.7. Ensayo de Porosidad

Se tomaron las imágenes en un microscopio óptico, se tiene las imágenes en el siguiente cuadro con el tamaño de filamento promedio por cada porcentaje de relleno o *infill*.

Se tiene en la tabla 3.7 los valores experimentales para los parámetros que se necesitan en la ecuación mostrada en la sección 2.3.8, donde el diámetro de filamento promedio se calculó de las imágenes tomadas y mostradas en la tabla 3.8.

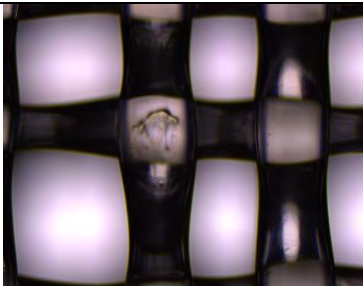
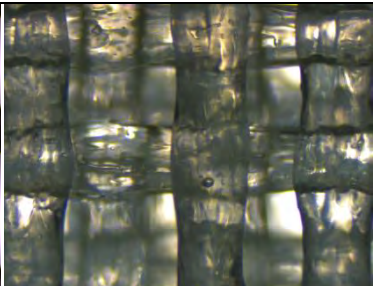
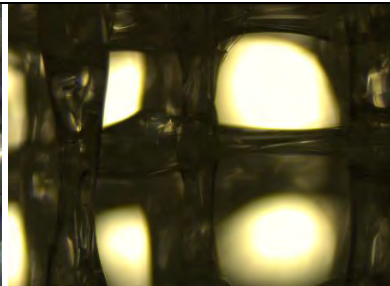
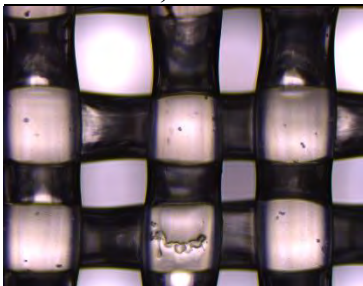
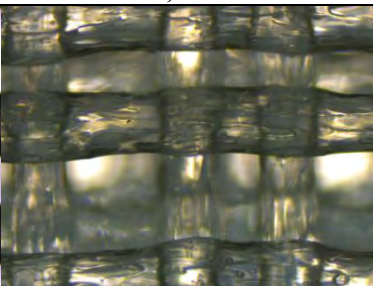
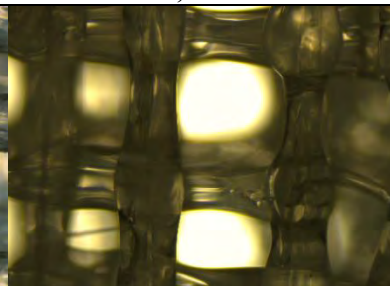
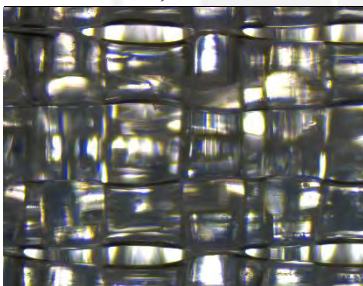
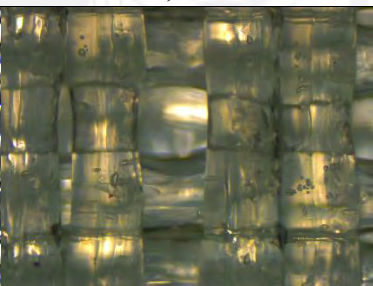
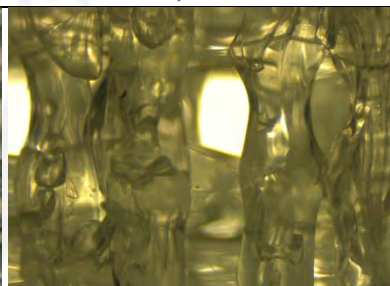
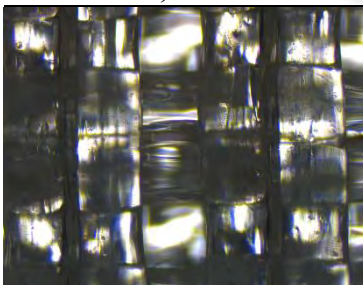
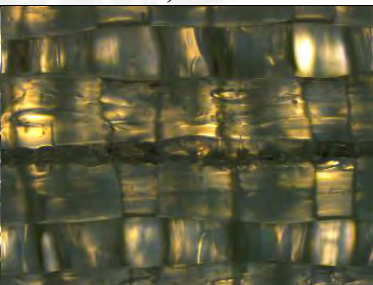
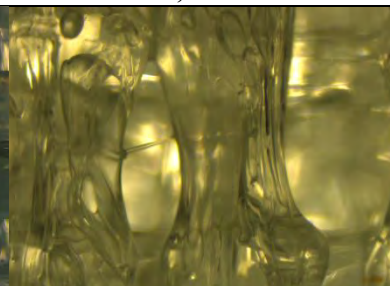
Entre las observaciones que se muestran en los resultados, a mayor porcentaje de relleno, el número de filamentos por capas aumenta lógicamente, mostrándose ello en la tabla 3.7, el diámetro de filamento para cada porcentaje de PEG, no se vio afectado por el porcentaje de relleno, pero si hubo una diferencia cuando el porcentaje de PEG aumentaba, debido a su temperatura de degradación del mismo era menor a la del PLA, haciendo que la estructura ordenada de la matriz polimérica se vea afectada por el efecto del PEG degradándose, generando esto una mayor porosidad dada en los resultados de la tabla 3.8

**Tabla 3.7.** Resultados de la determinación de datos para el cálculo del porcentaje de porosidad

| Relleno (Infill) | Altura promedio ( $h$ ) (mm) | Ancho promedio ( $w$ ) (mm) | Diámetro de filamento promedio ( $\phi$ ) ( $\mu\text{m}$ ) | Número de capas ( $Nl$ ) | Numero de filamentos por capas ( $Nc$ ) |
|------------------|------------------------------|-----------------------------|---|--------------------------|---|
| PLA              |                              |                             |   |                          |   |
| 50%              | $2,16 \pm 0,06$              | $10,26 \pm 0,07$            | $290,44 \pm 50,70$  | 10                       | 13                                      |
| 60%              | $2,12 \pm 0,01$              | $10,11 \pm 0,09$            | $355,53 \pm 26,57$  | 10                       | 14                                      |
| 70%              | $2,08 \pm 0,06$              | $10,18 \pm 0,03$            | $318,31 \pm 10,41$  | 10                       | 18                                      |
| 80%              | $2,07 \pm 0,03$              | $10,18 \pm 0,02$            | $328,90 \pm 16,84$  | 10                       | 20                                      |
| PLA/PEG 5%       |                              |                             |   |                          |   |
| 50%              | $1,96 \pm 0,06$              | $10,22 \pm 0,03$            | $355,11 \pm 14,91$  | 10                       | 13                                      |
| 60%              | $2,07 \pm 0,03$              | $10,35 \pm 0,08$            | $334,67 \pm 25,98$  | 10                       | 14                                      |
| 70%              | $1,91 \pm 0,05$              | $10,26 \pm 0,15$            | $334,70 \pm 25,83$  | 10                       | 18                                      |
| 80%              | $1,94 \pm 0,07$              | $10,28 \pm 0,09$            | $325,11 \pm 46,06$  | 10                       | 20                                      |
| PLA/PEG 10%      |                              |                             |   |                          |   |
| 50%              | $2,04 \pm 0,02$              | $10,17 \pm 0,02$            | $277,89 \pm 65,12$  | 10                       | 10                                      |
| 60%              | $1,96 \pm 0,06$              | $10,22 \pm 0,04$            | $296,27 \pm 87,36$  | 10                       | 11                                      |
| 70%              | $1,94 \pm 0,04$              | $10,21 \pm 0,04$            | $335,05 \pm 71,03$  | 10                       | 15                                      |
| 80%              | $2,03 \pm 0,03$              | $10,24 \pm 0,04$            | $346,78 \pm 101,65$   | 10                       | 17                                      |

De las imágenes tomadas en el microscopio óptico, se tiene que el valor de relleno o *infill* dado en la tabla 3.8 se relaciona con la porosidad teórica, obtenida de la ecuación 4, teniendo los resultados experimentales descritos en la tabla 3.9.

**Tabla 3.8.** Imágenes tomadas del microscopio óptico y su porcentaje de porosidad experimental

|             | PLA   | PLA/PEG 5%   | PLA/PEG 10%   |
|-------------|---|--|---|
| 50% relleno |    |    |    |
|             | <b>61,13 %</b>  | <b>42,75 %</b>   | <b>70,76 %</b>  |
| 60% relleno |    |    |    |
|             | <b>35,14 %</b>  | <b>35,43 %</b>   | <b>62,14 %</b>  |
| 70% relleno |  |  |  |
|             | <b>32,35 %</b>  | <b>19,18 %</b>   | <b>33,23 %</b>  |
| 80% relleno |  |  |  |
|             | <b>19,31 %</b>  | <b>16,74 %</b>   | <b>22,76 %</b>  |

**Tabla 3. 9.** Resultados de porosidad teórica para matrices de PLA al 50% y 80% de relleno

| Porcentaje de relleno | Peso (g)<br>( $\pm 0.001$ ) | h (mm)<br>( $\pm 0.01$ ) | l (mm)<br>( $\pm 0.01$ ) | w (mm)<br>( $\pm 0.01$ ) | Porosidad promedio |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|
| 50                    | 0,122                       | 2,05                     | 10,15                    | 10,1                     | 55,21 $\pm$ 2.163  |
|                       | 0,1172                      | 2,05                     | 10,12                    | 10,12                    |                    |
|                       | 0,1098                      | 2,04                     | 10,11                    | 10,1                     |                    |
| 80                    | 0,2076                      | 2,06                     | 10,1                     | 10,13                    | 20,226 $\pm$ 0.486 |
|                       | 0,2065                      | 2,05                     | 10,1                     | 10,11                    |                    |
|                       | 0,2077                      | 2,04                     | 10,12                    | 10,1                     |                    |

De los resultados obtenidos se concluye que tanto la porosidad teórica (Ecuación 4) como la porosidad experimental (Ecuación 3) se correlacionan en la determinación de la porosidad de las matrices poliméricas, siendo estas parecidas y comparables tanto para el caso del PLA al 50% y 80% de relleno, donde valores experimentales al 50% de relleno (55,21) es comparable con el 61% obtenido tomando un diámetro de filamento promedio por la observación con el microscopio, además de notarse la misma correlación cuando el relleno es de 80% ( 20,26% y 19,31% respectivamente),

### **3.2. Ensayos de degradación de las matrices porosas.**

#### **3.2.1. Ensayo de degradación hidrolítica.**

La velocidad de degradación de la matriz polimérica porosa es importante debido a que el espacio y la superficie recién generados por la degradación son esenciales para la proliferación y la distribución de las células que se regeneran. El nuevo espacio interconectado generado por degradación podría actuar como un canal para el intercambio de nutrientes y la formación de una matriz extracelular. La rigidez de la matriz podría debilitarse en general cuando la matriz polimérica se degrada. Por esta razón, se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre la degradación de la matriz, usando la solución de fluido corporal simulado. Se debe considerar que por lo general, los polímeros sintéticos tienen características de degradación lenta y, por tanto, son demasiado difíciles de evaluar en un período limitado de tiempo.

Este ensayo también sirvió para poder mineralizar la superficie con una capa de hidroxiapatita y determinar las propiedades que esta pueda tener en la superficie de la matriz porosa [19].

La solubilidad de los componentes de la matriz porosa mostrada en la Tabla 3.9 para diferentes tipos de solventes, nos dan una idea del tipo de comportamiento que tendrá el fluido vivo simulado, donde el PEG soluble propiciará la degradación del PLA.

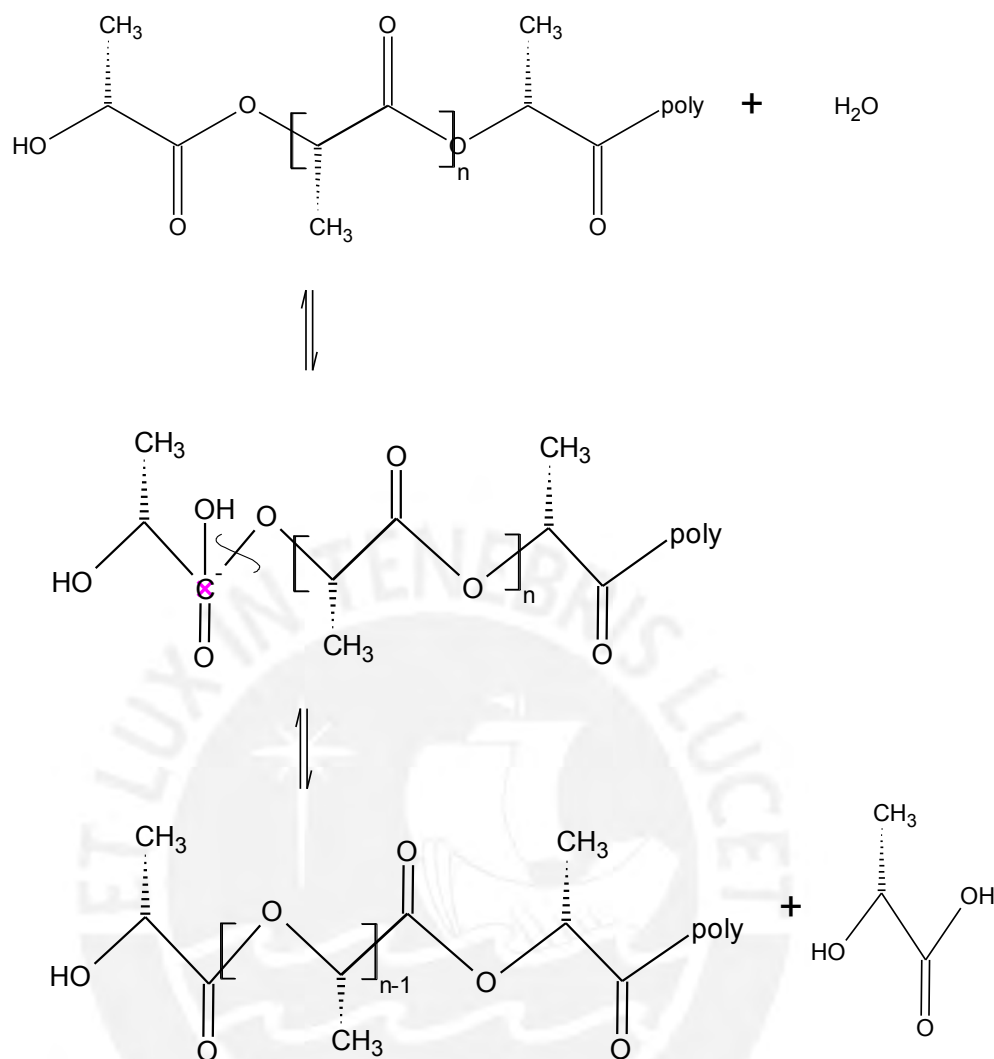
**Tabla 3.10.** Solubilidad del PLA y PEG en diferentes solventes [66]

| <b>Solvente</b>                 | <b>PLA</b> | <b>PEG</b>          |
|---------------------------------|------------|---------------------|
| Agua                            | Insoluble  | Soluble             |
| CHCl <sub>3</sub>               | Soluble    | Soluble             |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | Soluble    | Soluble             |
| DMF                             | Soluble    | Soluble             |
| Etanol                          | Insoluble  | Soluble en caliente |
| Acetona                         | Insoluble  | Soluble             |

El mecanismo de degradación en el fluido corporal simulado, se da mediante el enlace éster de la cadena polimérica del PLA. En la figura 3.9, se muestra una molécula de agua que ataca de modo selectivo el carbono contiguo al enlace éster de la cadena polimérica, generando la partición y disminución del peso molecular de la misma, con la consecuente liberación del ácido láctico en el fluido simulado, siendo este proceso demasiado lento, pues el PLA llega a degradarse completamente en 30 a 40 años [5].

Por otro lado, el PEG es soluble en un medio acuoso como el fluido corporal simulado donde se ha evaluado su degradación. El incremento de la degradación se manifiesta en una pérdida de peso en el tiempo, lo cual se evidencia solo a un porcentaje de PEG mayor o igual a 10% (Figura 3.12), ya que para los casos de las matrices de PLA (Figura 3.10) y PLA/PEG 5% (Figura 3.11) no se observa una pérdida constante de peso en el tiempo, más bien el aumento de peso observado se debe a la formación de sales en la superficie, como cloruro de sodio y cloruro de potasio presentes en el fluido corporal simulado.

Adicionalmente, la degradación de los polímeros aumenta cuando disminuye la cristalinidad, pero en este caso, al ser el PLA/PEG un filamento que contiene PEG, la degradación aumenta debido a la movilidad creciente de las moléculas de PLA debido a que el PEG actúa como un plastificante.



*Figura 3.9. Mecanismo de degradación del ácido poliláctico en un medio acuoso, similar al fluido corporal simulado [72]*

Finalmente, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y por el método de bajo vacío, se obtuvieron las imágenes mostradas en la figura 3.13 que nos pueden dar una idea de la morfología de las matrices porosas poliméricas cuando estas se encuentran sumergidas en el fluido corporal simulado por un periodo de 2 meses. Las matrices poliméricas se recubrieron con una delgada capa de oro para hacerlas conductoras en su superficie y se observaron a los aumentos de 40X y 100X.

Se tiene así que para un porcentaje de relleno de 70%, el efecto del PEG en la matriz es determinante al 10%, ya que se generan nuevos poros y una estructura más degradada debido a que el PEG disuelto en la solución generó la formación de una estructura con nuevas porosidades donde se puede dar la proliferación celular, o también se puede generar una

liberación de sustancias de manera más rápida por el efecto de tener nuevas cavidades y una estructura más porosa como se observa en la figura 3.13, donde a mayores porcentajes de PEG, la degradación aumenta significativamente, relacionándolos con los resultados gráficos obtenidos en las figuras 3.10, 3.11 y 3.12.

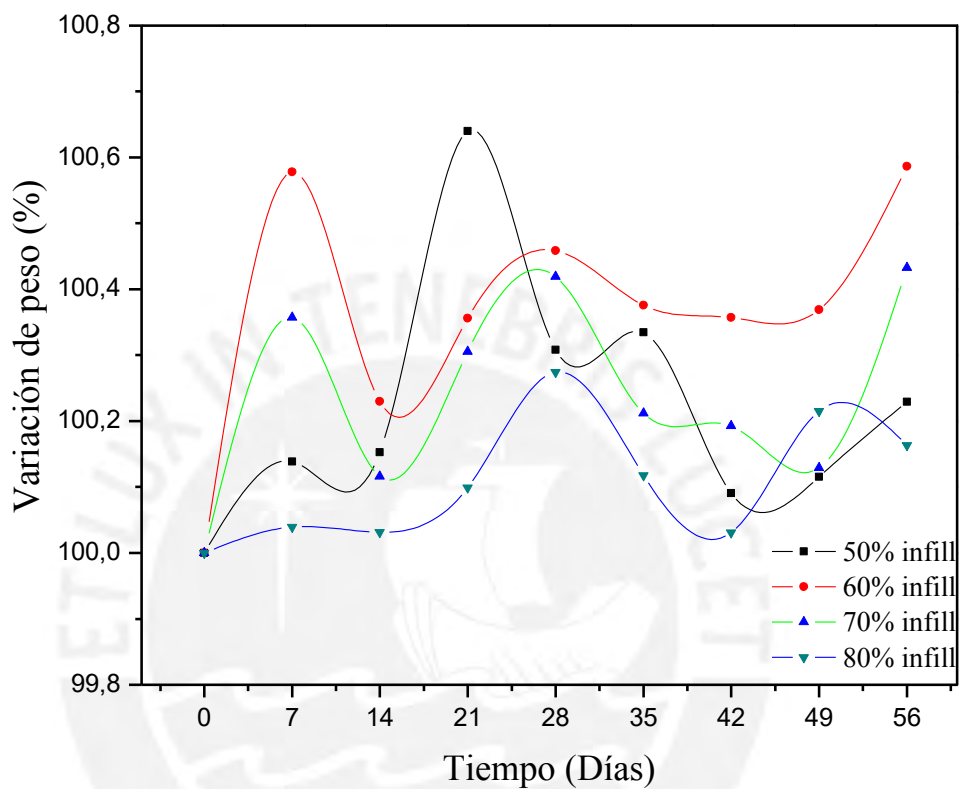


Figura 3.10. Variación en peso de PLA en 2 meses de sumergidas en SBF a  $37\pm 2$  °C



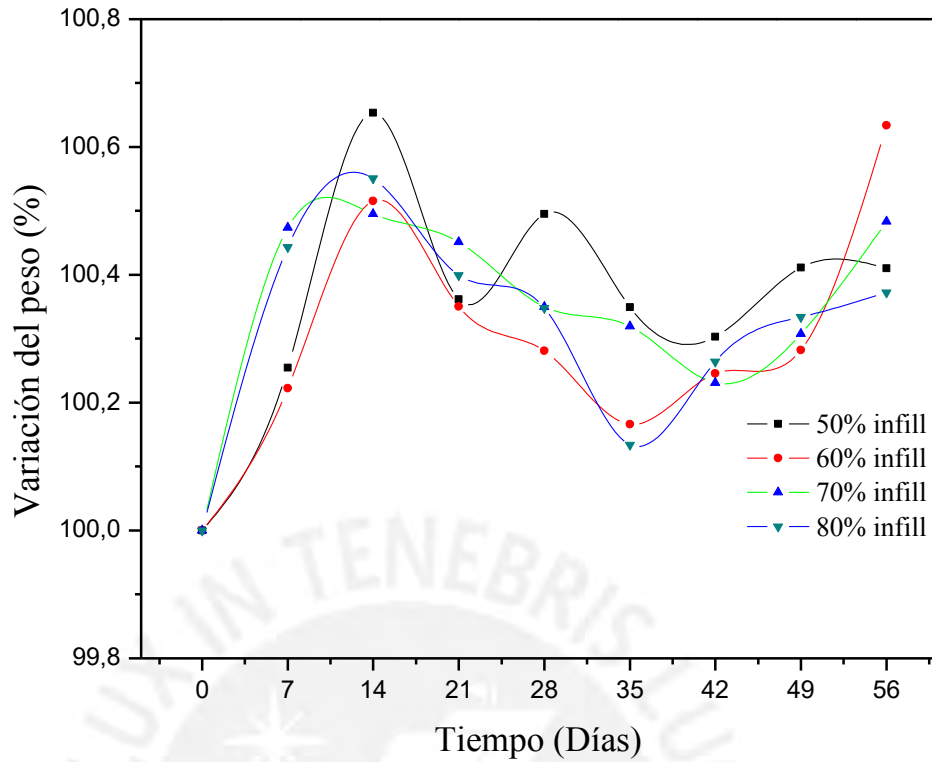


Figura 3. 11. Variación en peso de PLA/PEG 5% en 2 meses de sumergidas en SBF a  $37 \pm 2$  °C.

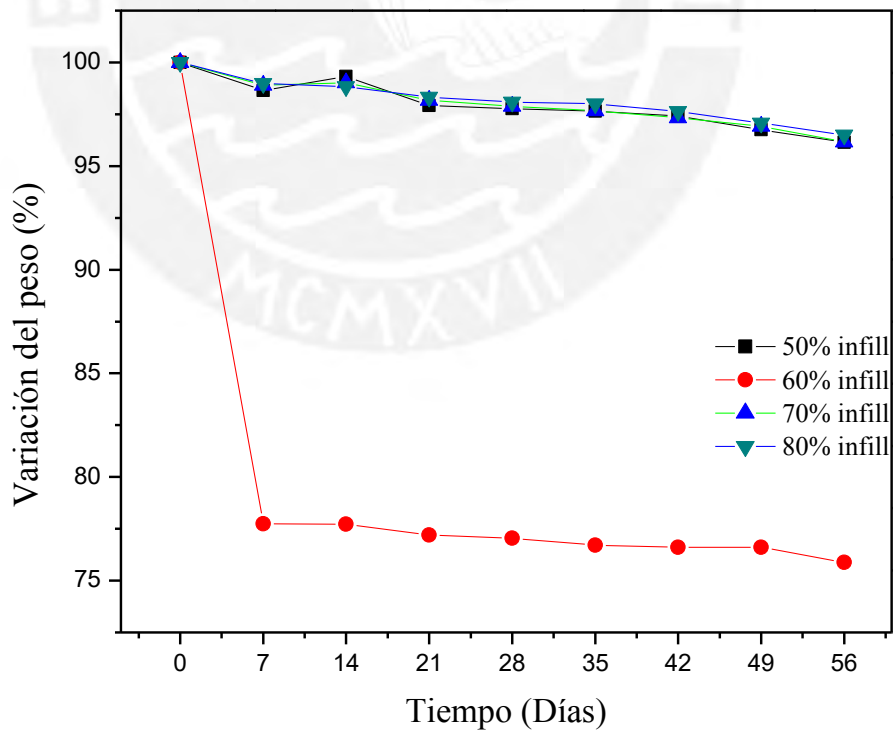
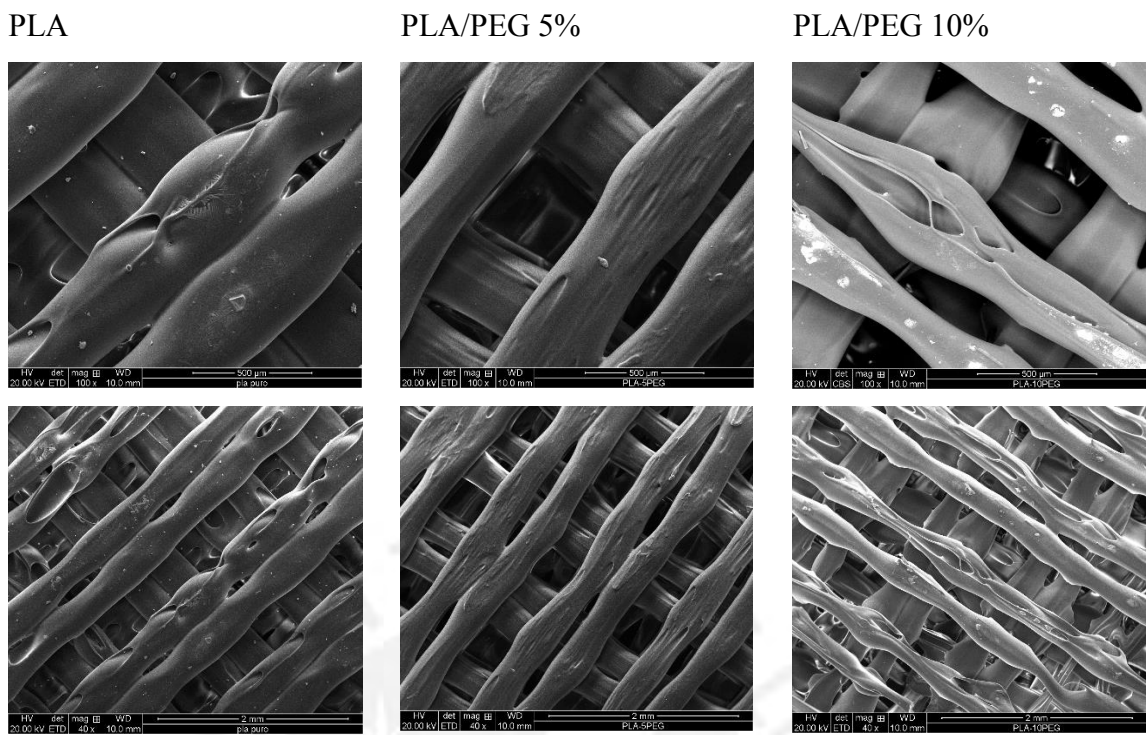


Figura 3.12. Variación en peso de PLA/PEG 10% en 2 meses de sumergidas en SBF a  $37 \pm 2$  °C.



*Figura 3. 13. Imágenes SEM del scaffold de PLA con diferentes porcentajes de PEG al 70% de infill luego de 2 meses de estar sumergido en SBF.*

### 3.2.2. Ensayo de degradación acelerada

La degradación acelerada utilizando una solución de hidróxido de sodio NaOH 0.1N se medirá con la pérdida de peso en el tiempo. Considerar que, como en el experimento de degradación hidrolítica con el fluido corporal, los ensayos acelerados usando NaOH son más adecuados que aquellos que usan enzimas para moléculas con un gran peso molecular ( $M_n > 5000$ ) [18], a la vez que son comparables con el ensayo de degradación hidrolítica.

Se tienen así los siguientes resultados gráficos, donde en todos los casos se observa una tendencia a la disminución del peso de modo constante en el tiempo, siendo mayor en las matrices poliméricas de PLA/PEG 10% (Figura 3.16) que llega a degradarse completamente en 80 horas. Se puede observar también, para los otros casos (Figura 3.14 y figura 3.15), que en el mismo tiempo (80 h) las matrices se degradan alrededor del 20%, completando su degradación en tiempos mayores a 350 horas.

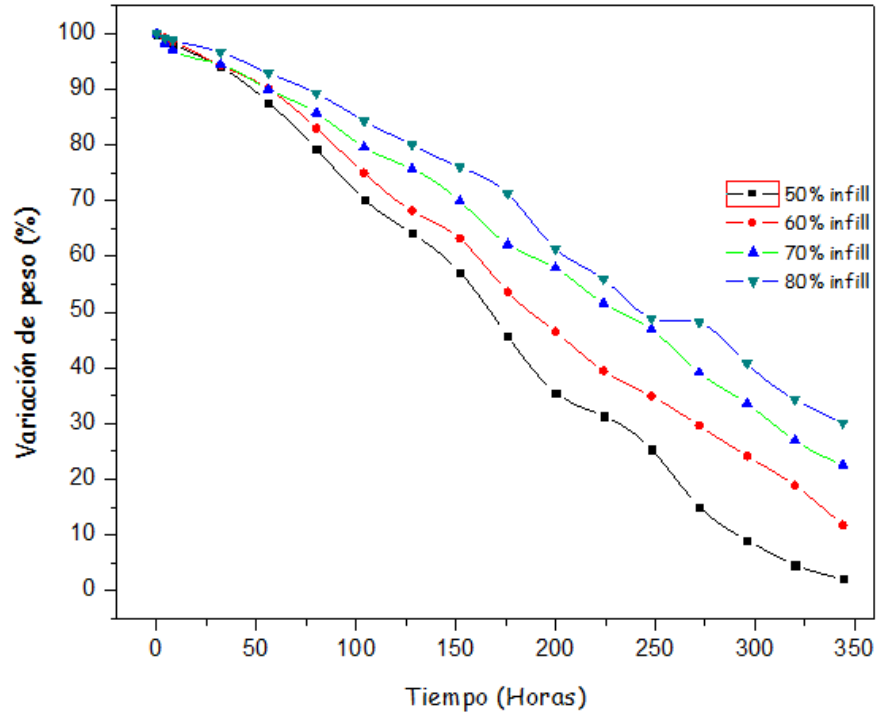


Figura 3. 14. Degradación acelerada de PLA en NaOH 0.1N

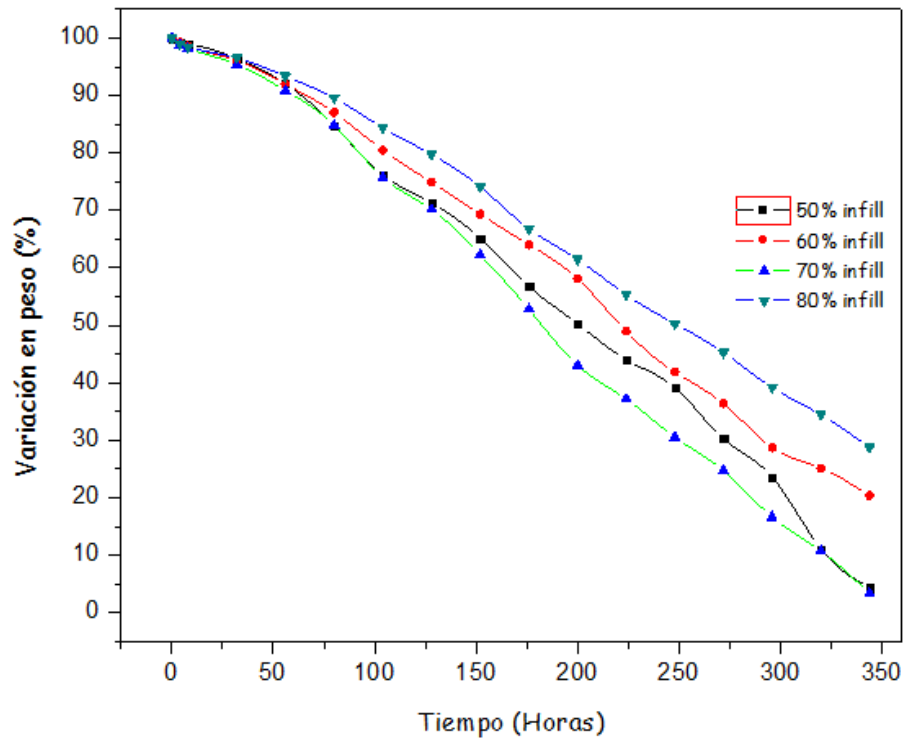


Figura 3. 15. Degradación acelerada de PLA/PEG 5% en NaOH 0.1N

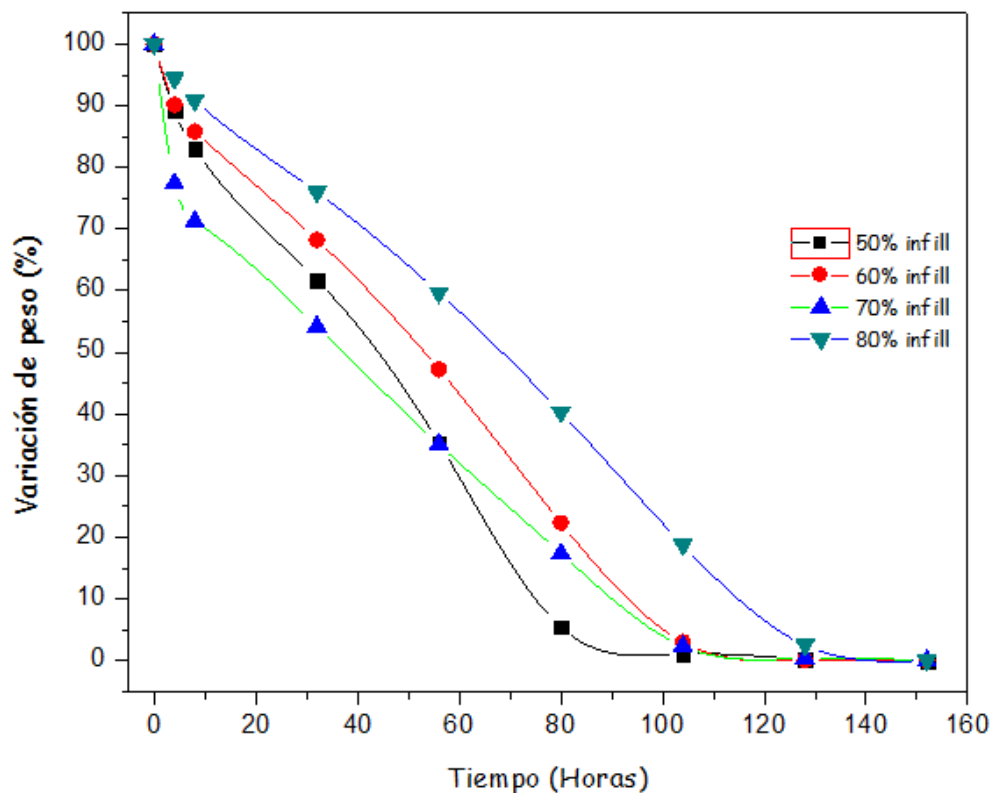


Figura 3. 16. Degradación acelerada de PLA/PEG 10% con diferente porcentaje de infill, en solución de NaOH 0.1 M a  $37 \pm 2$  °C.

### 3.3. Liberación controlada

Una vez obtenidas las matrices porosas cargadas con ácido úsnico y recubiertas con quitosano, al agitarse en una solución tampón según las condiciones expuestas en el acápite 2.4.5, se obtuvieron las curvas de liberación.

#### 3.3.1. Curvas de liberación

Para la liberación controlada se ha empleado una solución tampón de fosfato salino (*PBS: phosphate buffer saline*), la cual es una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución se prepara a partir de cloruro de sodio, fosfato de sodio y, en algunas formulaciones, con fosfato de potasio, dicha solución no es tóxica para las células de los mamíferos. El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal. El PBS se emplea comúnmente para lavar células mediante

centrifugado, simular condiciones fisiológicas y para la preparación de soluciones en determinaciones biológicas.

Para la cuantificación del ácido úsnico (AU) liberado hacia la solución, se tomaron las medidas de la absorbancia de una solución de cloroformo en AU extraído del PBS. Para poder determinar cuantitativamente la cantidad de fármaco por hora liberando en el PBS, se determinó el rango lineal donde se cumple la ley de Beer para el AU. Con este propósito se prepararon soluciones estándar de AU, de 40, 20, 12,5 y 5 ppm, para poder hallar la ecuación lineal (Figura 3.17) y relacionar los valores de absorbancia con la concentración.

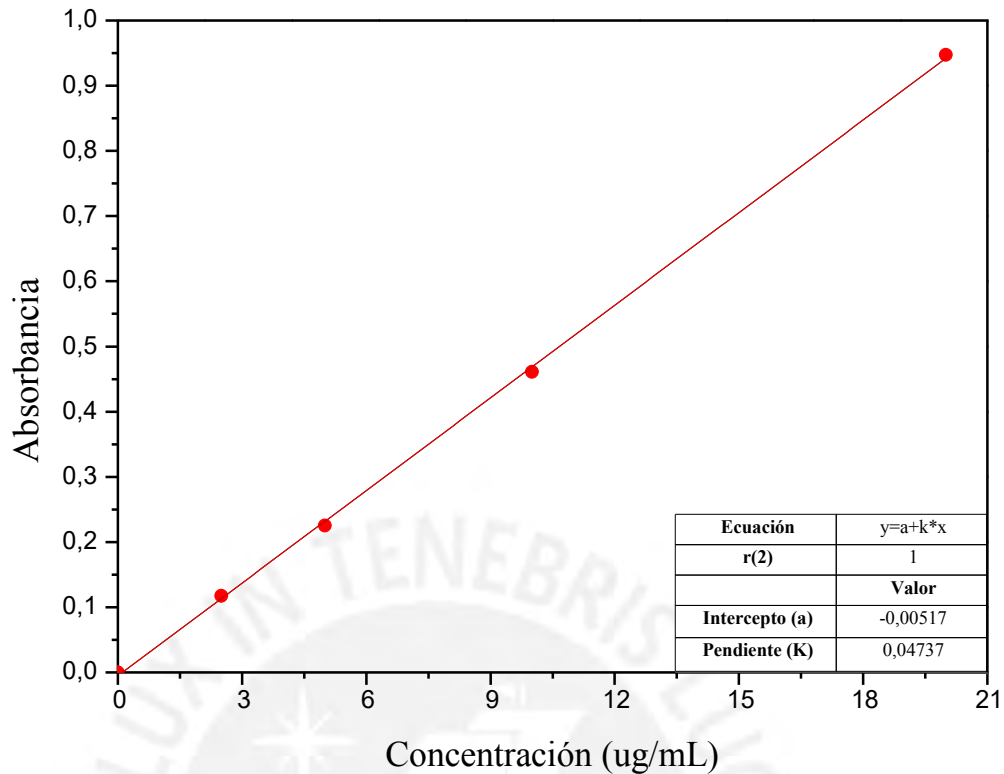
La masa en gramos se hallará con la ecuación 6.

$$masa = \frac{375 * 10^{-6} * Abs}{K} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Donde **Abs** es la absorbancia experimental medida en el equipo, **K** la pendiente de la recta hallada con la curva de calibración, la cual da un valor de 0.04737, para hallar el porcentaje de masa liberado se determina mediante la ecuación 7.

$$\% \text{ liberado} = \left( \frac{masa}{masa \text{ inicial}} \right) * 100 \quad \text{(Ecuación 7)}$$

A partir de la ecuación 7, se puede graficar el porcentaje liberado en función del tiempo, mostrándose estos resultados en las figuras 3.18, 3.19 y 3.20.



*Figura 3.17. Curva de determinación del rango lineal donde se cumple la ley de Beer para el AU.*

La figura 3.18 muestra las curvas de liberación, la línea roja indica un modelo de liberación farmacológica ideal, mostrándose los valores experimentales de nuestra liberación, evidenciando un mayor porcentaje de liberación cuando se tiene un porcentaje de *infill* o relleno al 50%, debido al mayor espacio presente en la estructura por ser un porcentaje de relleno menor, lo cual permite que se difunda con mayor facilidad el líquido por los poros, pudiendo dispersarse con mayor facilidad el AU en la solución. Porcentajes de liberación que subían y bajaban en el tiempo, nos indican la liberación constante y controlada en el mismo, llegando a las 10 horas a llegar a una concentración de equilibrio, en el tiempo (40% de AU liberado para 50% de relleno, 25% de AU liberado para 60% de relleno, 25% de AU liberado para 70% de relleno y 40 % aproximado cuando el relleno es del 80%).

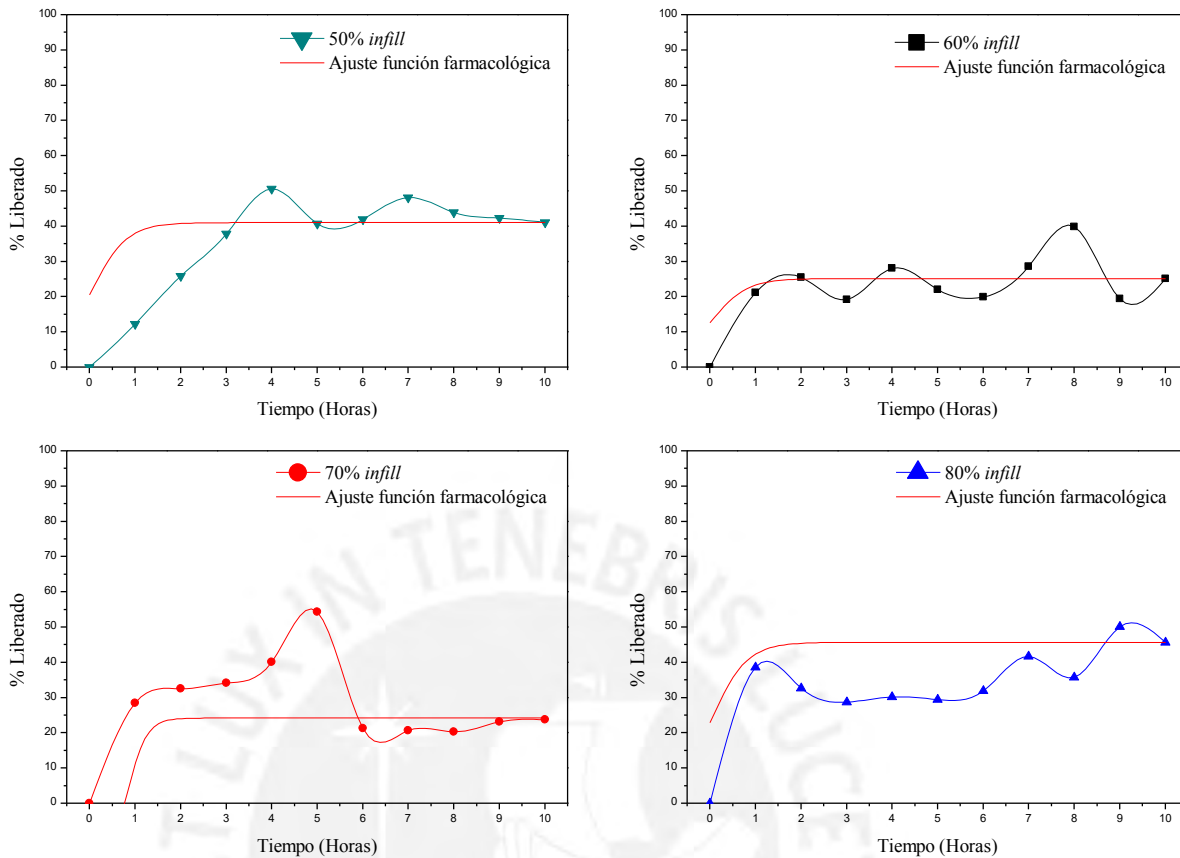


Figura 3.18. Curvas de liberación controlada para PLA en 10 horas en PBS

Para hallar la constante de velocidad  $K_H$ , se utilizará la siguiente ecuación:

$$M_t/M_0 = Q = K_H t^{1/2}$$

Donde  $M_t$  es el porcentaje de la droga en el tiempo,  $M_0$  es el porcentaje inicial,  $a$  es el porcentaje inicial de la droga en la solución antes de la liberación, y  $K_H$  la constante de liberación en el tiempo [73].

Se tiene así los siguientes valores obtenidos para cada matriz polimérica porosa en las tablas 3.10, 3.11 y 3.12.

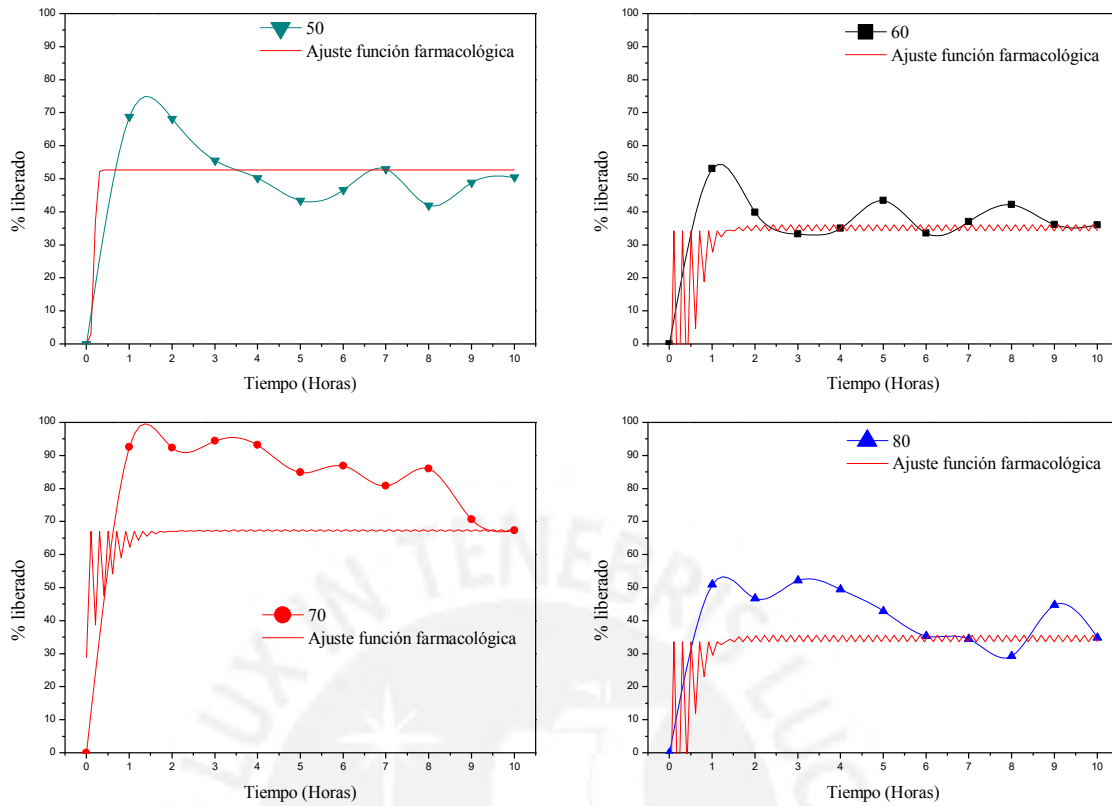


Figura 3.19. Curvas de liberación controlada para PLA/PEG 5% en 10 horas en PBS.

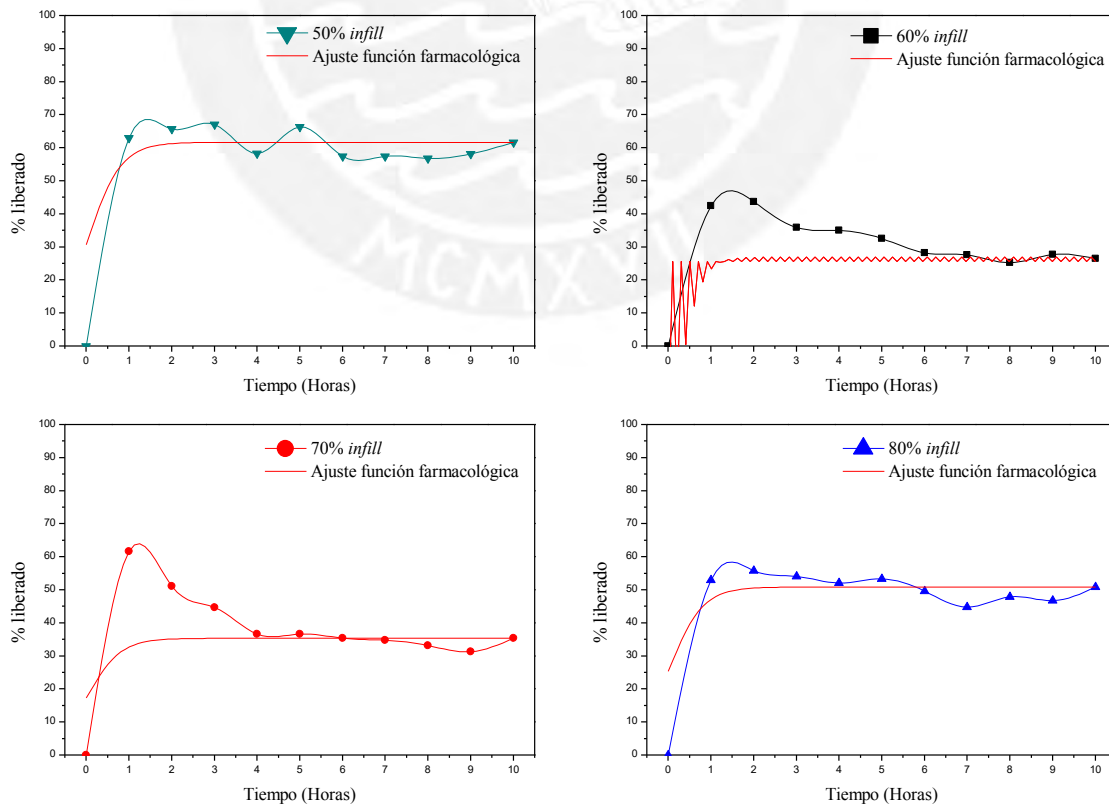


Figura 3.20. Curvas de liberación controlada para PLA/PEG 10% en 10 horas en PBS



**Tabla 3.11.** Constante de velocidad KH para las matrices porosas de PLA.

| Valores de $K_H$ para las matrices porosas de PLA |               |               |               |               |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Tiempo  | 50            | 60            | 70            | 80            |
| 1   | 0,1222        | 0,2112        | 0,2844        | 0,3866        |
| 2   | 0,2581        | 0,2547        | 0,3251        | 0,3261        |
| 3   | 0,3790        | 0,1924        | 0,3415        | 0,2874        |
| 4   | 0,5062        | 0,2808        | 0,4007        | 0,3014        |
| 5   | 0,4067        | 0,2203        | 0,5431        | 0,2945        |
| 6   | 0,4197        | 0,1990        | 0,2132        | 0,3194        |
| 7   | 0,4820        | 0,2854        | 0,2070        | 0,4166        |
| 8   | 0,4400        | 0,3990        | 0,2030        | 0,3573        |
| 9   | 0,4231        | 0,1944        | 0,2311        | 0,5009        |
| 10  | 0,4104        | 0,2516        | 0,2370        | 0,4571        |
| <b>Promedio</b>                                   | <b>0,3847</b> | <b>0,2489</b> | <b>0,2986</b> | <b>0,3647</b> |
| <b>Desviación estándar</b>                        | <b>0,1136</b> | <b>0,0631</b> | <b>0,1086</b> | <b>0,0736</b> |

**Tabla 3.12.** Constante de velocidad KH para las matrices porosas de PLA/PEG 5%.

| Valores de $K_H$ para las matrices porosas de PLA/PEG 5% |               |               |               |               |
|--|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Tiempo   | 50            | 60            | 70            | 80            |
| 1  | 0,6882        | 0,5315        | 0,9254        | 0,5098        |
| 2  | 0,6814        | 0,3986        | 0,9439        | 0,4684        |
| 3  | 0,5555        | 0,3325        | 0,9701        | 0,5221        |
| 4  | 0,5029        | 0,3500        | 0,9726        | 0,4944        |
| 5  | 0,4340        | 0,4349        | 0,8490        | 0,4288        |
| 6  | 0,4669        | 0,3348        | 0,8690        | 0,3540        |
| 7  | 0,5300        | 0,3701        | 0,8078        | 0,3458        |
| 8  | 0,4197        | 0,4226        | 0,8601        | 0,2936        |
| 9  | 0,4894        | 0,3612        | 0,7070        | 0,4486        |
| 10   | 0,5048        | 0,3596        | 0,6736        | 0,3488        |
| <b>Promedio</b>  | <b>0,5273</b> | <b>0,3896</b> | <b>0,8578</b> | <b>0,4214</b> |
| <b>Desviación estándar</b>                               | <b>0,0924</b> | <b>0,0608</b> | <b>0,1039</b> | <b>0,0804</b> |

**Tabla 3.13.** Constante de velocidad  $K_H$  para las matrices porosas de PLA/PEG 10%.

| Valores de $K_H$ para las matrices porosas de PLA/PEG 10% |               |               |               |               |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Tiempo  | 50            | 60            | 70            | 80            |
| 1   | 0,6303        | 0,4240        | 0,6163        | 0,5294        |
| 2   | 0,6568        | 0,4363        | 0,5105        | 0,5586        |
| 3   | 0,6714        | 0,3585        | 0,4466        | 0,5408        |
| 4   | 0,5827        | 0,3499        | 0,3661        | 0,5214        |
| 5   | 0,6631        | 0,3257        | 0,3665        | 0,5329        |
| 6   | 0,5738        | 0,2826        | 0,3541        | 0,4962        |
| 7   | 0,5743        | 0,2755        | 0,3478        | 0,4477        |
| 8   | 0,5684        | 0,2523        | 0,3319        | 0,4792        |
| 9   | 0,5821        | 0,2774        | 0,3131        | 0,4680        |
| 10  | 0,6168        | 0,2651        | 0,3536        | 0,5088        |
| <b>Promedio</b>   | <b>0,6120</b> | <b>0,3247</b> | <b>0,4007</b> | <b>0,5083</b> |
| <b>Desviación estándar</b>                                | <b>0,0409</b> | <b>0,0661</b> | <b>0,0958</b> | <b>0,0351</b> |

De las tablas 3.10; 3.11 y 3.12, se observan los diferentes valores de la constante de velocidad  $K_H$ , indicándose que un valor mayor en ella, dará como resultado un porcentaje de liberación mayor en el tiempo estudiado, notándose una tendencia a la disminución conforme el porcentaje de *infill* o relleno aumentaba, donde para el PLA 50% *infill* el  $K_H$  tenía un valor de 0.3847, mientras que cuando llegaba a tener un *infill* de 80%, el valor de  $K_H$  llegaba a ser de 0.3647, haciéndose este efecto más pronunciado conforme aumentaba el % de PEG en la matriz (PLA/PEG 5% con 50% *infill*  $K_H$  0.5273 y a 80% *infill* 0.4214 y para el PLA/PEG 10% con 50% *infill*  $K_H$  0.6120 y con 80% 0.5083), también notándose un aumento en el valor de  $K_H$  a mayor porcentaje de PEG. Esto se explica por dos motivos, a mayor porcentaje de PEG, la matriz es más hidrofílica y soluble en el medio, esto se observó en los ensayos de degradación, la capacidad de degradarse más rápido hará que se libere con mayor facilidad y en mayor proporción el fármaco en el *PBS*, además, el efecto que tiene la matriz de evitar el paso del fluido conforme aumenta el % de *infill*, ya que espacios más pequeños entre capas harán más difícil que la solución penetre en la matriz, y hará más lento la liberación en el medio.

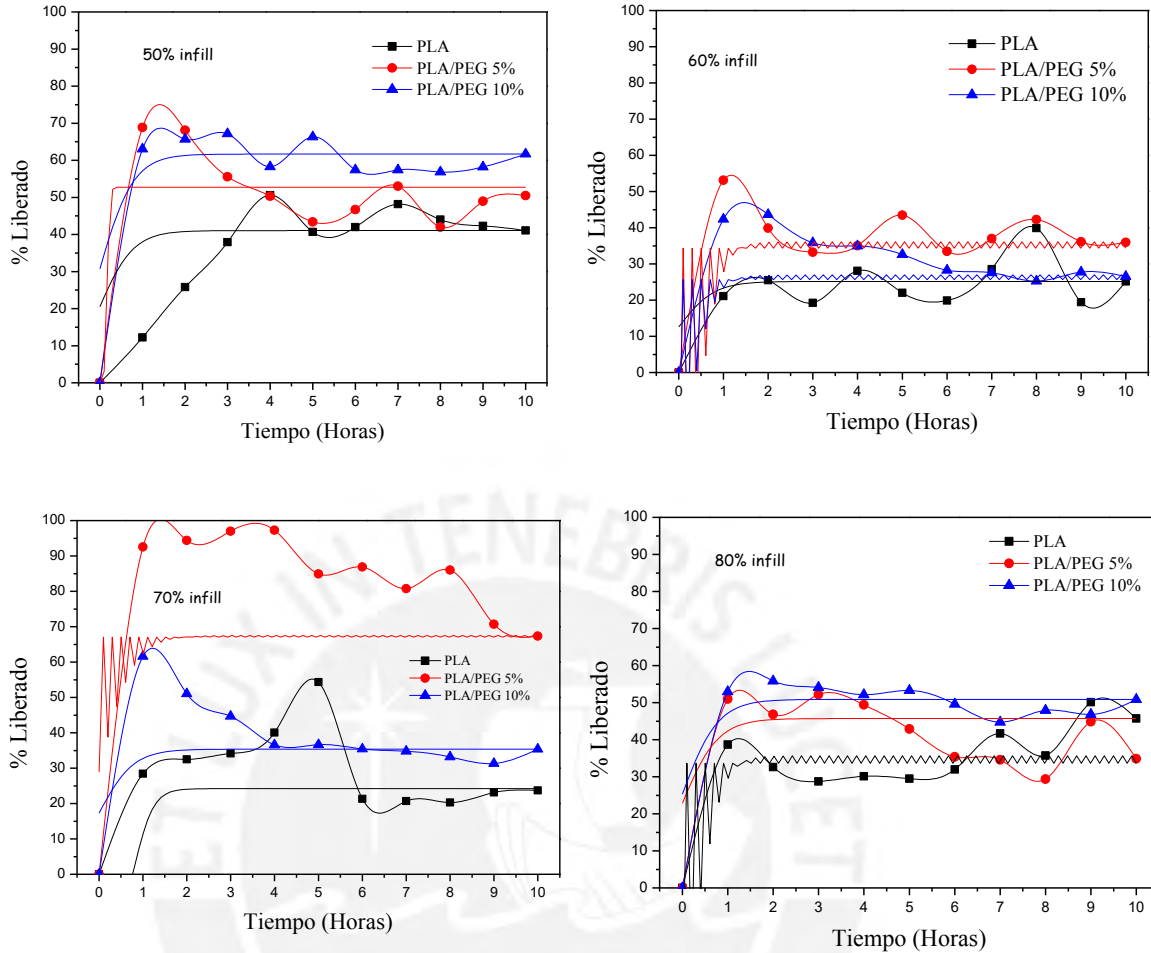


Figura 3.21. Comparación entre el porcentaje de liberación de fármaco en relación con el infill o relleno para el PLA, PLA/PEG 5% y PLA/PEG 10%.

De la figura 3.21, se nota una tendencia en el aumento del % liberado conforme aumentaba el porcentaje de PEG en la matriz porosa para los porcentajes de *relleno* de 50% y 80%, como en estos dos se observó esa tendencia, se sumergió las matrices porosas cargadas con ácido úsnico, en una solución de quitosano disuelto en ácido acético, para estudiar el efecto de la película de polímero sobre la liberación controlada.

Se observa gráficamente la leve disminución del % liberado en el tiempo para las matrices con una película de quitosano y sin el mismo, el quitosano a  $\text{pH} \approx 7.0$ , no es muy soluble y mantiene se condición de estar como película en la solución [71], esta película, semipermeable, permite el paso dosificado y lento, del líquido de PBS hacia la matriz, y del

fármaco a la solución, haciendo una liberación más controlada y lenta, observándose ese efecto en las figuras 3.22, 3.23 y 3.24., donde el porcentaje de liberación son menores.

**Tabla 3.14.** Comparación de la constante de velocidad  $K_H$  para las matrices porosas de PLA con y sin quitosano.

| Valores de $K_H$ para las matrices porosas de PLA |               |               |               |               |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>Infill</i> (Relleno)                           | 50            |               | 80            |               |
|   | Con quitosano | Sin quitosano | Con quitosano | Sin quitosano |
| <b>Promedio</b>                                   | 0,1398        | 0,3847        | 0,2397        | 0,3647        |
| <b>Desviación estándar</b>                        | 0,0469        | 0,1136        | 0,04153       | 0,0736        |

La figura 3.23 como la figura 3.24, muestran el efecto de la matriz sobre la película de quitosano, menores valores de % de liberación comparados con las matrices sin el quitosano, efecto que promueve una liberación más dosificada y constante.

**Tabla 3.15.** Comparación de la constante de velocidad  $K_H$  para las matrices porosas de PLA/PEG 5% con y sin quitosano.

| Valores de $K_H$ para las matrices porosas de PLA/PEG 5% |               |               |               |               |
|--|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>Infill</i> (Relleno)                                  | 50            |               | 80            |               |
|  | Con quitosano | Sin quitosano | Con quitosano | Sin quitosano |
| <b>Promedio</b>  | 0,1981        | 0,5273        | 0,4214        | 0,4626        |
| <b>Desviación estándar</b>                               | 0,0780        | 0,0924        | 0,0804        | 0,0180        |

De la figura 3.24 se puede observar que el efecto del quitosano como película no afecta demasiado en el porcentaje liberado sin el quitosano, esto se debe a un efecto de la misma matriz polimérica de disolverse con mayor rapidez de la que pueda generar un control de la liberación con la película de quitosano[74].

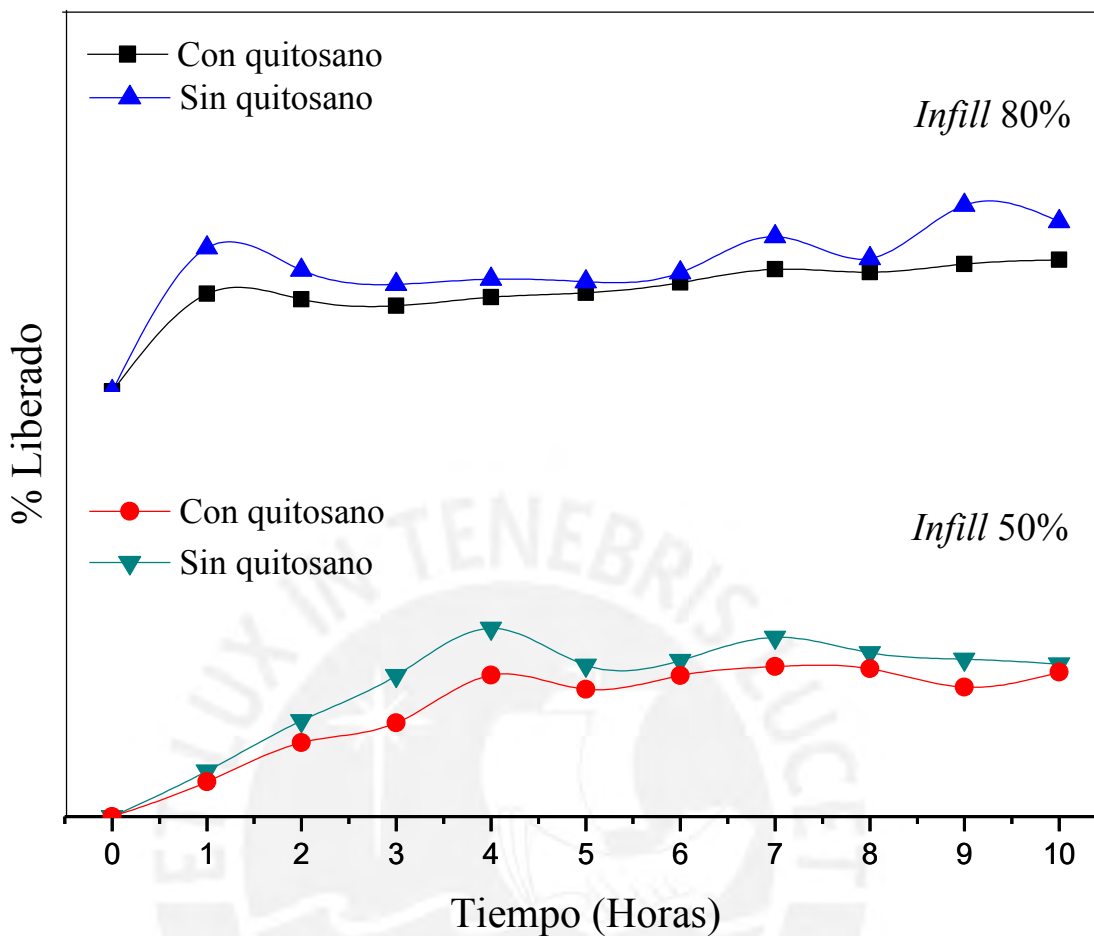


Figura 3.22 Comparación entre la liberación controlada de fármaco para el PLA con 50% y 80% de infill con y sin quitosano.

**Tabla 3.16.** Comparación de la constante de velocidad  $K_H$  para las matrices porosas de PLA/PEG 10% con y sin quitosano.

| Valores de $K_H$ para las matrices porosas de PLA/PEG 10% |               |               |               |               |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Infill (Relleno)  | 50            |               | 80            |               |
|   | Con quitosano | Sin quitosano | Con quitosano | Sin quitosano |
| <b>Promedio</b>   | 0,2946        | 0,3120        | 0,2581        | 0,3083        |
| <b>Desviación estándar</b>                                | 0,0725        | 0,0409        | 0,1080        | 0,0351        |

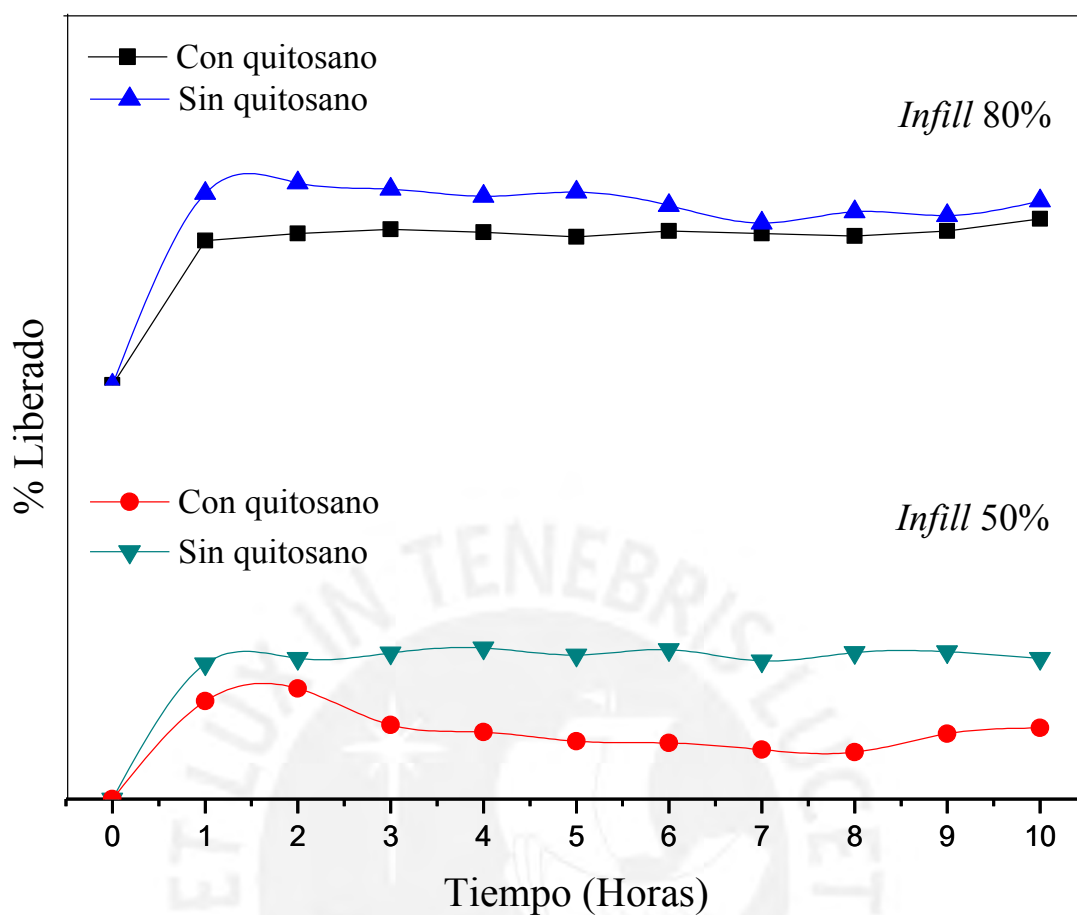


Figura 3.23. Comparación entre la liberación controlada de fármaco para el PLA/PEG 5% con 50% y 80% de infill con y sin quitosano.

El efecto del quitosano como película hizo que disminuyera levemente el valor  $K_H$  de la liberación, teniendo valores menores al mismo y gráficas que evidencian una menor liberación en el tiempo, concluyendo que el quitosano como polímero que cubre la matriz, promueve la dosificación del fármaco más lento y de modo constante.

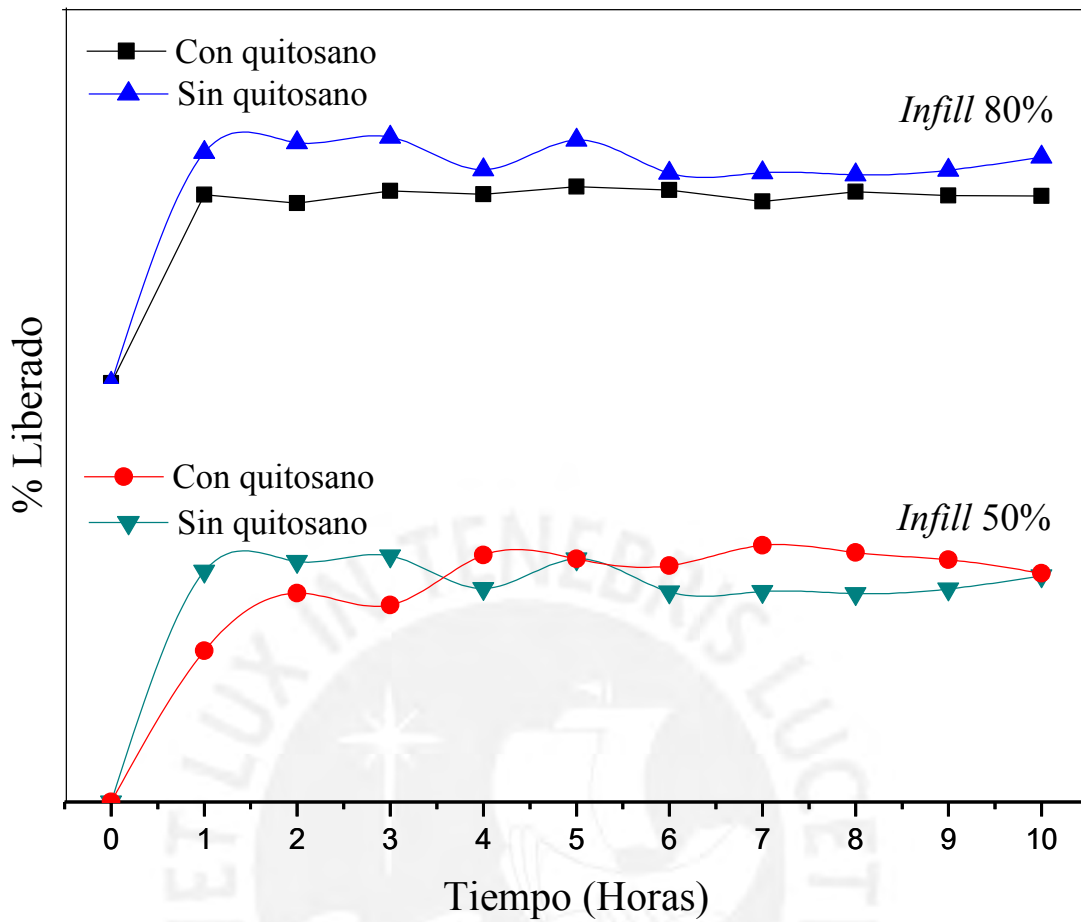


Figura 3.24. Comparación entre la liberación controlada de fármaco para el PLA/PEG 10% con 50% y 80% de infill con y sin quitosano.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron filamentos de ácido poliláctico (PLA) con 0%, 5% y 10% de polietilenglicol (PEG) de 1.75 +/- 0.5 mm de diámetro promedio, el cual es adecuado para la impresión 3D. Los parámetros más importantes del proceso realizado en un extrusor de doble husillo fueron: 215 °C de temperatura de extrusión, 13.5 mm/min de velocidad de estiramiento y enfriamiento en un baño de agua a 40 °C.

Se fabricaron matrices porosas de ácido poliláctico (PLA) y polietilenglicol (PEG) con 50, 60, 70 y 80% de relleno, de formas cuadrada de 5 cm de lado y circular 6.25 cm de diámetro, ambas de 2 cm de espesor, utilizando la técnica de modelado por deposición fundido usada en impresión 3D.

El índice de fluidez (MFI) de las matrices porosas, se incrementa con el porcentaje de PEG, desde 8.4g/10min para PLA puro hasta 24.8 g/10min para el PLA/PEG 10%, lo cual demuestra que el PEG actúa como plastificante del PLA.

La temperatura de transición vítrea de las matrices poliméricas disminuye gradualmente desde 55°C para el PLA puro hasta 41 °C para el PLA/PEG 10%, evidenciando el efecto plastificante del PEG en el filamento de matriz PLA. Asimismo, la cristalinidad se incrementa con el porcentaje de PEG: 7.27 para el PLA, 24.93 para el PLA/PEG 5% y 29.83 para el PLA/PEG 10%.

La degradación hidrolítica mostró una disminución constante del peso de la matriz porosa, solo en el caso de PLA/PEG 10%, posiblemente debido a que el PEG influye en la degradación de la matriz solo a partir del 10%.



Según los resultados de la degradación acelerada, en todos los casos se observa una degradación constante en el tiempo, siendo mayor en las matrices poliméricas de PLA/PEG 10% que llega a degradarse completamente en 80 horas; mientras que las matrices de PLA y PLA/PEG 5% completan su degradación en tiempos mayores a 350 horas. Este resultado confirma la influencia del PEG en la mayor degradación de la matriz porosa.

Los ensayos de porosidad indicaron una relación entre la porosidad nominal, teórica y experimental de la matriz polimérica, notándose esto en los resultados de la tabla 3.8 y 3.9, notándose un aumento en el valor de la misma, debido a la degradación del PEG conforme se daba el proceso de impresión, esta degradación generó la presencia de más espacios entre filamentos al imprimirse, ocasionando una mayor porosidad.

La liberación del fármaco en una solución tampón salina (*PBS: phosphate buffer saline*) durante 10 horas, se ha evaluado mediante la constante de liberación ( $K_H$ ). La liberación del fármaco disminuye con la película de quitosano ( $K_H = 0.1398$ ) en comparación con la matriz sin quitosano ( $K_H = 0.3847$ ) para el PLA puro a 50% de relleno (*infill*). Este efecto es constante en las tres matrices poliméricas, pues también en la matriz de PLA/PEG 10% y 80% de relleno dichos valores disminuyen desde  $K_H = 0.3083$  sin quitosano hasta  $K_H = 0.2581$  con quitosano, evidenciándose una menor dosificación del fármaco en la solución y un mayor control de su concentración durante las 10 horas del ensayo. Asimismo, la liberación del fármaco aumenta a mayores porcentajes de PEG, para porcentajes de relleno de la matriz de 50% y 80%.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] I. Zein, D. W. Huttmacher, K. Cheng, and S. Hin, “Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications,” vol. 23, pp. 1169–1185, 2002.
- [2] P. Xuan, L. Æ. Jin, W. Lee, and D. Cho, “Development of 3D PPF / DEF scaffolds using micro-stereolithography and surface modification,” pp. 271–279, 2009.
- [3] M. Ali, E. Pages, A. Ducom, S. Catros, J. Fricain, B. Guillotin, B. Pippenger, R. Bareille, M. Remy, E. Lebraud, and B. Desbat, “Laser-assisted bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and.”
- [4] S. Bose, S. Vahabzadeh, and A. Bandyopadhyay, “Bone tissue engineering using 3D printing,” *Mater. Today*, vol. 16, no. 12, pp. 496–504, 2013.
- [5] S. Bose, J. Darsell, M. Kintner, H. Hosick, and A. Bandyopadhyay, “Pore size and pore volume effects on alumina and TCP ceramic scaffolds,” vol. 23, pp. 479–486, 2003.
- [6] Norma\_europea\_13432, “Envases y embalajes. Requisitos de los envases y embalajes valorizables mediante compostaje y biodegradación. Programa de ensayo y criterios de evaluación para la aceptación final del envase o embalaje.,” pp. 1–26, 2001.
- [7] P. Bordes, E. Pollet, and L. Avérous, “Progress in Polymer Science Nanobiocomposites : Biodegradable polyester / nanoclay systems,” vol. 34, pp. 125–155, 2009.
- [8] ASTM\_D1238-13, “Standard Test Method for Melt Flow Rates of Thermoplastics by Extrusion,” pp. 1–16, 2017.
- [9] J. Milton Harris, *Polyethylene glycol chemistry*. .
- [10] F. Bustinza, “Contribución al estudio de las propiedades antibacterianas y antifúngicas del ácido úsnico y de algunos de sus derivados,” pp. 1–25, 1947.
- [11] B. R. Jayakumar, “An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering,” *Int. J. Biol. Macromol.*, pp. 1–70, 2016.
- [12] G. Erkizia, “Simulación in-silico de la degradación de scaffolds y liberación de fármacos,” pp. 12–16, 2012.
- [13] J. P. Vacan and R. Langer, “Tissue engineering : the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation,” pp. 1–3, 1999.

- [14] M. S. Chapekar, "Tissue Engineering : Challenges and Opportunities," vol. 20899, no. June, pp. 617–620, 2000.
- [15] A. Kharlamov and P. W. Serruys, "Freeing the vessel from metallic cage : what can we achieve with bioresorbable vascular scaffolds ?," pp. 141–154, 2012.
- [16] N. zgu O, "Preparation of Porous  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  and beta- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Bioceramics," vol. 84, no. 2000, pp. 1581–1584, 2015.
- [17] A. Pesquet and R. Restrepo, "PROCESAMIENTO , CARACTERIZACIÓN Y ENSAYOS BIOLÓGICOS DE SCAFFOLDS POLIMÉRICOS NATURALES Y SINTÉTICOS PARA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO Y CARTILAGINOSO," vol. 2351, pp. 9–19, 2014.
- [18] S. K. Sahoo, A. K. Panda, and V. Labhsetwar, "Characterization of Porous PLGA / PLA Microparticles as a Scaffold for Three Dimensional Growth of Breast Cancer Cells," pp. 1132–1139, 2005.
- [19] c. osvaldo et al., "Estudio comparativo de distintas matrices de una poliesteramida en la liberación controlada de fármacos," pp. 1–97.
- [20] P. X. Ma and R. Zhang, "Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds," pp. 1–3, 2001.
- [21] Z. Ge, S. Baguenard, L. Yong, A. Wee, and E. Khor, "Hydroxyapatite – chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes," vol. 25, pp. 1049–1058, 2004.
- [22] C. Rica and L. Tecnol, "Andamiajes tridimensionales tipo esponjas basados en bioconjugados colágeno-quitosano como potencial biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos Three-dimensional scaffolds Sponges type based in bioconjugates collagen-chitosan as a potential bi," no. 7, pp. 43–48, 2012.
- [23] L. Vianey, T. López, J. Servando, C. Carmona, and A. V. Mariñelarena, "Culcyt // Síntesis y Caracterización Síntesis y caracterización de micelas poliméricas de mPEG-PCL para sistemas de suministro de fármacos : rescatando un proceso sencillo Resumen Introducción," no. 57, 2007.
- [24] J. G. Ocampo, D. Marcela, E. Sierra, C. Patricia, and O. Orozco, "hidroxiapatita , revisión del estado del arte Methods for manufacturing hydroxyapatite porous bodies , art state review Métodos de fabricação de corpos porosos de hidroxiapatita , revisão do estado da arte," vol. 27, no. 2, pp. 55–70, 2014.

- [25] C. W. Hull, "United States Patent [ 19]. Patent number 4929402," 1990.
- [26] P. E. Ruggiero, "United States Patent [19]. Patent number 511329," 1992.
- [27] S. Haggerty, J. Michael, and P. A. Williams, "Unlted States Patent [19]. Patent number 5204055," 1993.
- [28] B. C. Gross, J. L. Erkal, S. Y. Lockwood, C. Chen, and D. M. Spence, "Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 7, pp. 3240–3253, 2014.
- [29] R. Jones, P. Haufe, E. Sells, P. Iravani, V. Olliver, C. Palmer, A. Bowyer, D. Age, W. P. Avenue, and N. Zealand, "RepRap – the replicating rapid prototyper," vol. 29, pp. 177–191, 2011.
- [30] D. Bak, "Feature Rapid prototyping or rapid production ? 3D printing processes move industry towards the latter," vol. 23, no. 4, pp. 340–345, 2003.
- [31] B. K. Gu, D. J. Choi, S. J. Park, M. S. Kim, C. M. Kang, and C. Kim, "3-dimensional bioprinting for tissue engineering applications," *Biomater. Res.*, pp. 1–8, 2016.
- [32] D. W. Hutmacher, M. Sittinger, and M. V. Risbud, "Scaffold-based tissue engineering: Rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems," *Trends Biotechnol.*, vol. 22, no. 7, pp. 354–362, 2004.
- [33] C. W. Hull, "Apparatus for production of three dimensional objects by stereolithography," 4575330, 1986.
- [34] Z. Ge, Z. Jin, and T. Cao, "Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration.," *Biomed. Mater.*, vol. 3, no. 2, p. 22001, 2008.
- [35] M. Roman and F. Navarro, "Deposition of Cellulose Nanocrystals by Inkjet Printing," pp. 157–171, 2010.
- [36] T. Boland, T. Xu, B. Damon, and X. Cui, "Application of inkjet printing to tissue engineering," pp. 910–917, 2006.
- [37] M. Guvendiren, J. Molde, R. M. D. Soares, and J. Kohn, "Designing Biomaterials for 3D Printing," 2016.
- [38] C. Review, "Analytical Methods," vol. 3, no. 12, 2011.
- [39] M. Domingo, S. Borrós, and G. Reyes, "A methodology to choose the best building direction for Fused Deposition Modeling end- use partsA methodology to choose ... A methodology to choose the best building direction for Fused Deposition Modeling

- end-use parts,” no. October, 2014.
- [40] M. Characteristics, O. F. Fused, D. Modeling, B. Styles, E. Fodrang, M. Koch, and U. Menon, “No Title,” pp. 419–442.
- [41] R. Van Weeren, M. Agarwala, V. R. Jamalabad, and A. Bandyophadyay, “Quality of Parts Processed by Fused Deposition,” pp. 314–321.
- [42] P. Taylor, L. Avérous, and L. Ave, “Journal of Macromolecular Science , Part C : Polymer Reviews Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch : A Review Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch : A Review,” no. June 2012, pp. 37–41, 2007.
- [43] C. Lárez Velásquez, “Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica,” *Rev. Cient. UDO Agric.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–22, 2008.
- [44] E. D. E. Posgrado, “Pontificia universidad católica del Perú,” 2016.
- [45] P. D. Dalton and T. Woodfi, “Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering,” *Bone*, vol. 32, no. 3, pp. 2004–2005, 2008.
- [46] “Trabajo monográfico, curso de Polímeros (Quijano Rentería José Jhonatan).” .
- [47] R. Auras, B. Harte, and S. Selke, “An Overview of Polylactides as Packaging Materials,” pp. 835–864, 2004.
- [48] M. S. Lopes, A. L. Jardim, and R. M. Filho, “Poly ( lactic acid ) production for tissue engineering applications,” vol. 42, no. August, pp. 1402–1413, 2012.
- [49] J. Skowrya, K. Pietrzak, and M. A. Alhnan, “Fabrication of extended-release patient-tailored prednisolone tablets via fused deposition modelling (FDM) 3D printing,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 68, pp. 11–17, 2015.
- [50] F. D. E. Farmacia, *Universidad de granada*. 2012.
- [51] S. A. Khaled, J. C. Burley, M. R. Alexander, and C. J. Roberts, “Desktop 3D printing of controlled release pharmaceutical bilayer tablets,” *Int. J. Pharm.*, pp. 1–7, 2013.
- [52] D. Yu, C. Branford-white, Z. Ma, L. Zhu, X. Li, and X. Yang, “Novel drug delivery devices for providing linear release profiles fabricated by 3DP,” vol. 370, pp. 160–166, 2009.
- [53] A. Goyanes, A. B. M. Buanz, A. W. Basit, and S. Gaisford, “Fused- filament 3D printing ( 3DP ) for fabrication of tablets,” vol. 476, pp. 88–92, 2014.

- [54] A. Goyanes, A. B. M. Buanz, G. B. Hatton, S. Gaisford, and A. W. Basit, “European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics tablets,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 89, pp. 157–162, 2015.
- [55] K. Pietrzak, A. Isreb, and M. A. Alhnan, “European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics A flexible-dose dispenser for immediate and extended release 3D printed tablets,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, no. August, 2015.
- [56] J. Vanessa, G. García, A. Ana, and P. De Abram, “Estudio de liberación de sulfadiazina de plata desde matrices de quitosano para su uso como apósitos en quemaduras,” Pontifice universidad católica del Perú, 2013.
- [57] M. Cocchietto, N. Skert, P. Luigi, and G. Sava, “A review on usnic acid , an interesting natural compound,” pp. 137–146, 2002.
- [58] M. Applications and P. Information, “Ingeo™ Biopolymer 4043D Technical Data Sheet 3D Printing Monofilament – General Purpose Grade,” no. 4, pp. 1–4.
- [59] ASTM E1252, “ASTM Standard Practice for General Techniques for Obtaining Infrared Spectra for Qualitative Analysis,” 2013.
- [60] ASTM International, “Standard Test Method for Transition Temperatures and Enthalpies of Fusion and Crystallization of Polymers by Differential Scanning,” *ASTM Stand.*, vol. D4318-8, pp. 1–7, 2012.
- [61] ASTM\_F1980-07, *Standard Guide for Accelerated Aging of Sterile Barrier Systems for Medical Devices*, vol. 7, no. Reapproved 2011. 2011.
- [62] ASTM, *F1635: In vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants*, vol. i. 2011.
- [63] T. Serra, M. Ortiz-hernandez, E. Engel, J. A. Planell, and M. Navarro, “Relevance of PEG in PLA-based blends for tissue engineering 3D-printed scaffolds,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 38, pp. 55–62, 2014.
- [64] “Estudio del comportamiento de andamios 3D de PLA/PEG para ingeniería de tejidos durante su degradación in vitro 1,” pp. 1–61.
- [65] A. Melocchi, F. Parietti, G. Loreti, A. Maroni, A. Gazzaniga, and L. Zema, “3D printing by fused deposition modeling (FDM) of a swellable/erodible capsular device for oral pulsatile release of drugs,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 30, pp. 360–367, 2015.
- [66] E. D. Riascos, *Micro/Nanofibras coaxiales de PLA/PEG para el encapsulamiento*

*de microorganismos de interés biomédico y alimentario. .*

- [67] F. Carrasco and O. O. Santana, “Procesado del ácido poliláctico (PLA) y de nanocompuestos PLA/Montmorillonita en planta piloto: Estudio de sus cambios estructurales y de su estabilidad térmica,” *Afinidad Lxvi*, vol. 1, pp. 107–113, 2010.
- [68] B. W. Chieng, N. A. Ibrahim, W. Zin, W. Yunus, and M. Z. Hussein, “Plasticized Poly ( lactic acid ) with Low Molecular Weight Poly ( ethylene glycol ): Mechanical , Thermal , and Morphology Properties,” pp. 4576–4580, 2013.
- [69] A. Guinault, “Effect of crystallization on barrier properties of formulated polylactide Effect of crystallization on barrier properties of formulated polylactide C ecile Courgneau , a , b Sandra Domenek , b R egis,” no. November 2014, 2012.
- [70] S. Pivsa-art, S. Thumsorn, and S. Pavasupree, “Effect of Additive on Crystallization and Mechanical Properties of Polymer Blends of Poly ( lactic acid ) and Poly [( butylene succinate ) - co -adipate ],” vol. 34, pp. 563–571, 2013.
- [71] G. Xu, S. Chen, X. Yan, C. Yang, and Z. Chen, “Synthesis and Hydrophilic Performance of Poly ( Lactic Acid ) -Poly ( Ethylene Glycol ) Block Copolymers,” no. March, pp. 299–305, 2016.
- [72] G. Kale, Æ. R. Auras, and Æ. S. Paul, “Degradation of Commercial Biodegradable Packages under Real Composting and Ambient Exposure Conditions,” pp. 317–334, 2006.
- [73] L. J. Valle, R. Camps, and A. Díaz, “Electrospinning of polylactide and polycaprolactone mixtures for preparation of materials with tunable drug release properties,” pp. 1903–1917, 2011.
- [74] L. Xiao, B. Wang, G. Yang, and M. Gauthier, “Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials : Synthesis , Modification and Applications,” *Biomed. Sci. Eng. Technol.*, pp. 247–282, 2006.