

REDES POLIMÉRICAS INTERPENETRADAS DE POLI (METACRILATO DE 2-
HIDROXIETILO-*co*-ACIDO ITACONICO) Y QUITOSANO COMO MATRIZ DE
LIBERACIÓN CONTROLADA.

JULIÁN ANDRÉS GARCÍA ZAPATA

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

MAESTRÍA EN FORMULACIÓN DE PRODUCTOS QUIMICOS Y DERIVADOS

SANTIAGO DE CALI

2019

REDES POLIMÉRICAS INTERPENETRADAS DE POLI (METACRILATO DE 2-
HIDROXIETILO-CO-ACIDO ITACONICO) Y QUITOSANO COMO MATRIZ DE
LIBERACIÓN CONTROLADA.

JULIÁN ANDRÉS GARCÍA ZAPATA

TUTOR: Dra. NORA ELENA VALDERRUTEN POSSO.

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

MAESTRÍA EN FORMULACIÓN DE PRODUCTOS QUIMICOS Y DERIVADOS

SANTIAGO DE CALI

2019

**FIRMAS AVAL DEL CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO
DE GRADO II**

Firma Aval del Asesor:

Nora E. Valderruten

Nora Elena Valderruten Posso

Firma del estudiante:

Julián Andrés García

Julián Andrés García Zapata

AGRADECIMIENTOS

Al terminar esta etapa quiero agradecer a:

A mis padres, hermano, abuela y a toda mi familia por, todos los sacrificios, penas y alegrías que compartieron conmigo, hoy dieron su recompensa.

A mis profesores, a la Dra. Nora Elena Valderruten Posso por sus valiosas sugerencias y su constante disposición durante todo este trabajo.

A mis compañeros, amigos y colegas por la motivación y la incondicionalidad.

Y a todos los que en su momento estuvieron junto a mí.

Muchas Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

1.	RESUMEN	9
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
3.	MARCO TEÓRICO.....	12
3.1.	Liberación controlada de sustancias activas.	12
3.2	Polímeros.....	13
3.2.1	Hidrogeles.	14
3.3.2	Copolímero metacrilato de 2-hidroxietilo y ácido itacónico.	15
3.3.3	Quitano.....	16
3.4	Redes Poliméricas Interpenetradas.	16
4.	OBJETIVOS.....	18
4.1	Objetivo general.	18
4.2	Objetivos específicos.....	18
5.	METODOLOGÍA.....	19
5.1.	Materiales y reactivos.....	19
5.2.	Síntesis de materiales interpenetrados.	19
5.3.	Caracterización fisicoquímica de los materiales	20
5.3.1.	Espectroscopia Infrarroja (FTIR).....	20
5.3.2.	Cinéticas de hinchamiento a diferentes pH.	20
5.3.3.	Degradabilidad.....	21
5.3.4.	Carga y liberación del fármaco.....	21
5.3.5.	Pruebas reológicas.....	22
5.3.6.	Análisis estadístico.....	22
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
6.1.	Síntesis de los materiales generados.....	23
6.2.	Caracterización fisicoquímica de los materiales.....	24
6.2.1.	Espectroscopia Infrarroja (FTIR).	24
6.2.2.	Cinéticas de Hinchamiento a diferentes pH.	27
6.2.3.	Comportamiento reológico.....	33
6.2.4.	Estudios de biodegradación enzimática.....	39
6.2.5.	Cinéticas de liberación de Diclofenaco sódico.	42
7.	CONCLUSIONES.....	52
9.	REFERENCIAS.....	55
10.	ANEXOS.....	60

TABAL DE TABLAS

Tabla 1: Composición de los hidrogeles IPN de quitosano/p(HEMA-co-IA).....	20
Tabla 2: Nivel de equilibrio de hinchamiento en el infinito (W_{∞}) y constantes cinéticas de segundo orden (k) para todos los materiales en los tres pHs estudiados.....	32
Tabla 3: Viscosidad residual (η_0) y valores de complianza (J_{oe} , J_{max} , J_{∞} , J_{kv}) para los diferentes materiales sintetizados.	36
Tabla 4: Porcentajes de deformación (S%) y recuperación (R%) para cada elemento de complianza de los diferentes materiales sintetizados	36
Tabla 5: Parámetros y coeficientes de determinación de los modelos cinéticos de liberación.	

TABLA DE FIGURAS.

Figura 1: Niveles mínimos terapéuticos(MEC) o tóxicos (MTC) y forma de dosificación de liberación inmediata versus controlada (26).....	12
Figura 2: estructura del metacrilato de 2-hidroxietilo	15
Figura 3 Representación de la estructura del quitosano.	16
Figura 4: Esquema teórico de la red de polímeros interpenetrantes (IPN).....	16
Figura 5: FTIR de quitosano comparado con el espectro hidrogel control Q1HIA0 5%.	24
Figura 6: Muestra de espectro infrarrojo de los materiales interpenetrados.....	25
Figura 7: FTIR de todos los materiales: Quitosano (línea negra), ácido itacónico (línea roja); HEMA (línea azul claro); Q1HIA0 3% (línea fucsia); Q1HIA0 5% (línea verde), Q1HIA0.5 3% (línea azul oscuro), Q1HIA0.5 5% (línea morada claro), Q1HIA1 3% (línea morada) y Q1HIA1 5% (línea vino tinto).....	26
Figura 8: curva de hinchamiento en los tres pH para todos los materiales: A. pH 1.2, B. pH 4.5, C. pH 6.8.....	28
Figura 9: curvas de hinchamiento transformadas a una cinética de segundo orden para todos los materiales en los 3 pH estudiados.	31
Figura 10: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la capacidad de hinchamiento máxima y la constante de hinchamiento.	33
Figura 11: Análisis de recuperación de fluencia para los materiales sintetizados.....	34
Figura 12: Análisis de relajación de la tensión en deformaciones de 5% para los materiales interpenetrados:	38
Figura 13: Dependencia del tiempo de la proporción del peso seco restante de los materiales en 0,01 mg ml ⁻¹ y 0,1 mg ml ⁻¹ de lisozima en un buffer de acetato pH 7,4 a 37°C ...	39
Figura 14: Diagrama de Pareto y Gráfico de interacción de los cuatro factores principales.	40
Figura 15: Gráfico de interacción de los cuatro factores principales.	41
Figura 16: Concentración disuelta de diclofenaco (ppm) contra tiempo (min).....	43
Figura 17: Reacción de ciclación del diclofenaco sódico a pH ácido (69).....	44
Figura 18: Gráficas obtenidas de la transformación de los datos a los distintos modelos cinéticos: A. Orden Cero, B. Orden 1, C. Korsmeyer-Peppas, D. Higuchi.....	46
Figura 19: Cinética de liberación de diclofenaco sódico de los materiales Q1HIA0 3%, Q1HIA0.5 3% y Q1HIA1 3% a diferentes pH y 37°C.	47
Figura 20: Cinética de liberación de diclofenaco sódico a pH 1.2, 4.5 y 6.8 para cada material.	48
Figura 21: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados sobre la constante de liberación (A) y la concentración final liberada (B).....	49
Figura 22: Gráfica de interacciones entre factores para la constante de liberación y la concentración final liberada.....	50
Figura 23: Gráfica de optimización de respuestas para la cinética de liberación.....	51

TABLA DE ANEXOS.

Anexo 1: Mecanismo de polimerización de HEMA por radicales libres.	60
Anexo 2: Representación del entrecruzamiento entre la P(HEMA-co-IA) y el DEGDA	61
Anexo 3: Mecanismos de entrecruzamiento de la genipina. Se ilustra la formación de una amida (1) y la formación de un heterociclo (2.....	62
Anexo 4: Mecanismo de entrecruzamiento de la genipina con la red de quitosano.....	63
Anexo 5 : Mecanismo de entrecruzamiento de la genipina con una segunda red de quitosano.....	64
Anexo 6: Optimización de respuesta realizado para los materiales sintetizados	65
Anexo 7: Grafica de contornos de K de hinchamiento vs. pH y composición	66
Anexo 8: Grafica de contornos de Concentración final liberada de diclofenaco sódico vs. pH y composición.....	66
Anexo 9: Grafica de contornos de K de liberación vs. pH y composición.....	67
Anexo 10: Grafica de contornos de K de hinchamiento vs. pH y composición.	67
Anexo 11: Grafica de efectos principales sobre la constante de liberación.	68
Anexo 12: Grafica de efectos principales sobre la concentracion final liberada del diclofenaco sodico	68
Anexo 13: Grafica de efectos principales para la relacion de hinchamiento en el infinito ..	69
Anexo 14: Regresión factorial general realizada para la degradacion de los materiales.	70
Anexo 15: Curva de calibracion realizada para la cuantificacion de diclofenaco.....	71

1. RESUMEN

Redes interpenetradas de quitosano y poli(metacrilato de 2-hidroxietilo-co-ácido itacónico) p(HEMA-co-IA) fueron sintetizadas. Los espectros de FTIR confirmaron el entrecruzamiento de quitosano y la polimerización del Metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) junto con el IA. Las propiedades de hinchamiento se estudiaron a diferentes pHs y se observó que dependen particularmente del contenido de quitosano y de la sensibilidad al pH dada por la incorporación de ácido itacónico en estos materiales.

La degradación de los materiales obtenidos se llevó a cabo con lisozima bajo condiciones fisiológicas simuladas, observándose una mayor degradación al incrementar el contenido de copolímero en su composición. Los estudios de análisis de fluencia – recuperación y relajación de esfuerzos demostraron que los materiales presentan un comportamiento viscoelástico, predominantemente elástico, lo cual no se ve afectado por el aumento del contenido de p(HEMA-co-IA) en el material. También se observó un decaimiento del módulo elástico a medida que pasa el tiempo cuando una tensión es ejercida.

El diclofenaco se usó como fármaco modelo para los estudios de liberación controlada, encontrándose que el proceso es controlado por difusión y la relajación de la red polimérica, donde a pH ácido está regido por la ley de Fick y a pH básico presenta un comportamiento anómalo. A su vez, los materiales interpenetrados liberaron menos de la mitad de la concentración del fármaco encapsulado en los primeros 15 minutos mostrando su uso como matriz de liberación controlada sensible al pH.

Palabras clave: *Red polimérica interpenetrada (IPN), hidrogel, quitosano, p(HEMA-co-IA), resistencia mecánica, pH- sensibilidad, Liberación controlada.*

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La mayoría de los medicamentos convencionales, como tabletas, cápsulas e inyectables, están formulados para liberar el ingrediente activo inmediatamente después de la administración, además se debe mantener una concentración del compuesto activo dentro de la región rango terapéutico. Esto requiere de administraciones repetidas para mantener la dosis efectiva del componente activo en el cuerpo. Lo anterior conlleva a un riesgo para el paciente por posible seguimiento irregular del tratamiento trayendo consigo efectos secundarios no deseados.

Para lograr mayor eficacia de los tratamientos y minimizar los efectos secundarios, se han desarrollado nuevos enfoques y estrategias para controlar la velocidad y el tiempo de administración. Con esto nace el desarrollo de sistemas de administración controlada de componentes activos. Una liberación controlada permitiría garantizar la cantidad indicada del agente activo (API) en el momento y en el lugar correcto. El sistema ideal de liberación controlada mantiene los niveles del API en un valor constante en un rango de acción específico deseado (1).

Un enfoque que ha recibido una atención creciente como un medio para controlar la liberación del componente activo ha sido la incorporación de estos componentes activos en polímeros (biopolímeros o polímeros sintéticos), cuyas propiedades podrían manipularse para mejorar la eficacia del sistema de liberación. Los polímeros son macromoléculas compuestas de muchas subunidades repetidas las cuales, dependiendo de su estructura, le confieren una amplia gama de propiedades físicas únicas, tales como la capacidad de absorber y retener ciertas sustancias, la tenacidad, la viscoelasticidad, la biodegradabilidad, biocompatibilidad, entre otras.

Al adaptar los polímeros de manera adecuada, o al utilizar diferentes procedimientos en su síntesis, los sistemas de liberación ahora pueden dispensar de una manera mucho más precisa y prolongada. Estos pueden clasificarse según su composición, como homopolímeros o copolímeros, o también según su estructura, como lineales, ramificados, entrecruzados e interpenetrados.

Las redes poliméricas interpenetradas (IPNs) son una combinación de dos o más polímeros que están, al menos parcialmente, entrelazadas en una escala molecular, pero no presentan uniones covalentes entre sí. Éstas han demostrado ser materiales que superan a las mezclas

de polímeros convencionales, debido a que combinan las propiedades más importantes de cada polímero, generando una mezcla sinérgica y, en consecuencia, los rangos de aplicaciones han crecido rápidamente para dicha clase de materiales, en especial, como dispositivo de liberación controlada (2, 3). Estudios anteriores sobre IPNs basados en quitosano y poli (metacrilato de 2-hidroxietilo) (pHEMA) mostraron que esta mezcla presentó una buena capacidad y liberación controlada, demostrando la efectividad de estos sistemas en su uso como portadores de sustancias activas (4-6).

El quitosano es un polímero natural que ha sido utilizado por la industria farmacéutica debido a su no citotoxicidad y biocompatibilidad, en especial en el área biomédica como biomembrana y sistemas de administración de fármacos (7-11). Los materiales a base de quitosano, generalmente, poseen una alta capacidad de absorber agua, permitiendo la capacidad de contener sustancias activas. No obstante, esta habilidad de retener agua altera sus propiedades mecánicas y, por lo tanto, disminuye su flexibilidad y resistencia, limitando su uso (8, 12-15).

El copolímero a base de pHEMA y ácido itacónico (IA) es un polímero sintético altamente hidrofílico que presenta características como biocompatibilidad, biodegradabilidad además de presentar capacidad antibacteriana significativa. Los hidrogeles a base de p(HEMA-co-IA) se han estudiado como sistemas de liberación controlada de fármacos para la vía de administración transdérmica y ocular debido a su resistencia mecánica. No obstante, presentar una buena propiedad mecánica limita su hinchamiento y por tanto la capacidad de carga de componentes activos se ve afectada (16-24).

Por ello, el propósito de este proyecto generar una red polimérica interpenetrada usando quitosano y metacrilato de 2-hidroxietilo copolimerizado con ácido itacónico con diferentes características de liberación y resistencia mecánica para identificar posibles usos de éstos en la liberación de principios activos.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. Liberación controlada de sustancias activas.

Cuando se utilizan sistemas convencionales de administración de fármacos, se debe mantener una concentración del compuesto activo dentro de la región rango terapéutico. Éste varía entre la concentración máxima tóxica (MTC) y la concentración mínima efectiva (MEC) (figura 1) (25).

Para mantener una concentración efectiva del fármaco, en los sistemas de administración convencionales, se utilizan dosificaciones a intervalos periódicos para mantener un nivel de concentración de fármaco deseado. Sin embargo, esto puede traer efectos secundarios no deseados.

Por estas razones, es de gran interés el desarrollo de formulaciones de liberación controlada y matrices que buscan mantener un nivel deseado fármaco en el plasma sanguíneo sin necesidad de aplicar consecutivas dosis, esto permite una mayor eficacia del tratamiento.

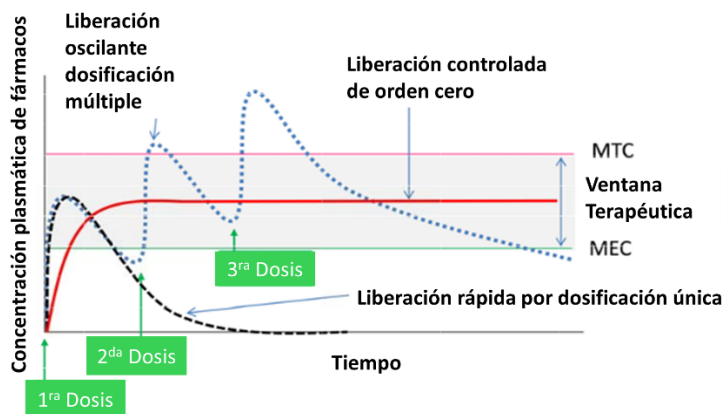


Figura 1: Niveles mínimos terapéuticos (MEC) o tóxicos (MTC) y forma de dosificación de liberación inmediata versus controlada (26).

Aunque en la actualidad existen sistemas de liberación modificada, se encuentran algunas ventajas que pueden apuntar al uso de macromoléculas como los polímeros en el desarrollo de nuevos dispositivos. Cuando los polímeros son fabricados, es posible controlar algunos aspectos de su estructura que permiten producir materiales adecuados para la aplicación

biológica deseada (27). Además, la estructura tridimensional y la composición química se pueden controlar para ajustar las propiedades de los materiales y la orientación de grupos funcionales específicos que pueden interactuar con el fármaco.

Los sistemas de liberación controlada a base de matrices poliméricas se pueden ubicar en cualquier parte del cuerpo, de modo que éstos puedan ponerse cerca de la zona afectada donde se requiere una acción del compuesto deseado a liberar. Se ha investigado la administración sistémica de medicamentos con polímeros a través de las membranas nasales (ruta nasal) (28), las membranas mucosas de la boca (ruta oral) (29), oculares (ruta oftálmica)(30), la piel (ruta transdermal) (31), entre otras.

3.2 Polímeros.

Los polímeros se definen como macromoléculas compuestas por una o varias unidades químicas (monómeros) que se repiten a lo largo de toda una cadena. Las características del polímero se ven afectadas por la composición del monómero, la arquitectura del polímero y el peso molecular. La cristalinidad del polímero es un factor importante en la biodegradación de éste, por lo cual se debe tener en cuenta en un sistema de liberación controlada (32).

Los polímeros biodegradables son particularmente atractivos para su aplicación como sistemas de liberación controlada, ya que una vez introducidos en el cuerpo humano, no requieren remoción ni manipulación adicional. Sus productos de degradación son metabolitos normales del cuerpo o productos que pueden metabolizarse y eliminarse fácilmente del cuerpo (33).

Algunos polímeros naturales, al ser biodegradables y con excelente biocompatibilidad, son materiales muy atractivos para su uso en sistemas de liberación controlada. Sin embargo, algunos de ellos presentan algunas limitaciones, como la pobre resistencia mecánica, alto grado de variabilidad en la calidad y pureza de derivados de fuentes animales, son en general estructuralmente más complejo y tienen el riesgo de contaminación por parte de patógenos externos (34).

Por otra parte, los polímeros sintéticos ofrecen una amplia variedad de composiciones con propiedades ajustables. Estos materiales abren la posibilidad de desarrollar nuevos sistemas de liberación controlada con propiedades específicas (químicas, interfaciales, mecánicas y biológicas) para una aplicación determinada, cambiando los monómeros o la técnica de preparación.

Adicionalmente, pueden poseer una gran resistencia mecánica según el método con el que se sintetizan: ya sea generando redes entrecruzadas de homopolímeros lineales, copolímeros lineales, copolímeros de bloque o de injerto, IPNs o mezclas físicas (3, 35, 36).

Una propuesta en el diseño de sistemas de liberación controlada está comprendida por la interpenetración de polímeros naturales y sintéticos. El propósito de esto es reunir en el mismo material las mejores propiedades del polímero natural (biodegradabilidad y biocompatibilidad) y el polímero sintético (propiedades mecánicas).

En general, los productos a base de polímeros se pueden clasificar como hidrogeles u órganogeles, dependiendo de la polaridad de los monómeros que esté compuesto. Los hidrogeles son materiales muy apropiados para aplicaciones en medicina, ya que muestran buenas propiedades de biocompatibilidad (18, 37). Su característica de hinchamiento en medio acuoso les aporta la propiedad de absorber, retener y liberar bajo condiciones controladas algunas soluciones de carácter fisiológico, utilizadas comúnmente en medicina (5, 38, 39)

3.2.1 Hidrogeles.

Un hidrogel es una red compuesta de cadenas de polímeros entrecruzados las cuales, por su composición química, son afines al agua (18, 40). El hecho de que puedan absorber y retener agua les confiere características como no citotoxicidad, y biocompatibilidad, además sus espacios porosos permiten la difusión selectiva de los solutos a través de la matriz (36, 40).

Se ha demostrado que los factores que determinan la capacidad de absorber y retener agua son: el peso molecular, el grado de pureza del polímero, su concentración en solución acuosa (35) y las condiciones físicas o químicas de la síntesis (35).

A pesar de estas propiedades ventajosas, los hidrogeles también tienen varias limitaciones. La baja resistencia mecánica de éstos limita su uso en aplicaciones de soporte de carga y puede provocar la disolución prematura o el flujo del hidrogel desde un sitio local específico.

La facilidad de aplicación también puede ser problemática; aunque algunos hidrogeles son suficientemente deformables para ser inyectables, muchos no lo son (41). Cada uno de estos problemas restringe significativamente el uso práctico de las terapias de administración de fármacos basadas en hidrogel en la clínica.

El alto contenido de agua de la mayoría de los hidrogeles generalmente produce una liberación relativamente rápida de medicamentos de la matriz de gel durante el período de horas o días (42). En respuesta a esto, se han explorado una serie de estrategias para reducir la tasa de liberación del fármaco de los hidrogeles. Estas pueden clasificarse según si aumentan las interacciones entre el fármaco y la matriz de hidrogel y/o aumentan la barrera difusiva para la liberación del fármaco desde el hidrogel.

3.3.2 Copolímero metacrilato de 2-hidroxietilo y ácido itacónico.

Metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) (43, 44) es un líquido viscoso incoloro con carácter hidrófilo, lo cual le da la característica de ser soluble en agua y en otros solventes polares. (figura 1):

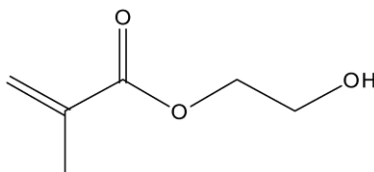


Figura 2: estructura del metacrilato de 2-hidroxietilo

El HEMA es uno de los monómeros utilizados más frecuentemente en la medicina como matriz implantable, así como andamio para ingeniería de tejidos, gracias a sus buenas características fisicoquímicas (no toxicidad, biocompatibilidad, resistencia a la degradación y la hidrólisis en condiciones fisiológicas) (16-20).

Se encontró que los hidrogeles basados en copolímeros de poli (metacrilato de 2-hidroxietilo-co-ácido itacónico) son biocompatibles y sensibles al pH (24). El ácido itacónico (IA) se copolimeriza fácilmente con el poli(metacrilato de 2 hidroxietilo) (HEMA) y proporciona cadenas poliméricas con grupos laterales carboxílicos, que son altamente hidrofílicos y capaces de formar enlaces de hidrógeno con los grupos correspondientes.

El ácido itacónico tiene dos grupos ácido carboxílico con diferentes valores de pKa ($pK_{a1} = 3,85$ y $5,45$), por lo que cantidades muy pequeñas de IA producen una buena respuesta al pH y aumentan el grado de hinchamiento del hidrogel donde es integrado. La incorporación de un ácido carboxílico a un polímero puede contribuir a la formación de enlaces de hidrogeno puede aumentar la resistencia mecánica de las redes poliméricas interpenetradas.

3.3.3 Quitosano.

El quitosano es un polímero natural derivado de la quitina, el cual es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza (7, 45).

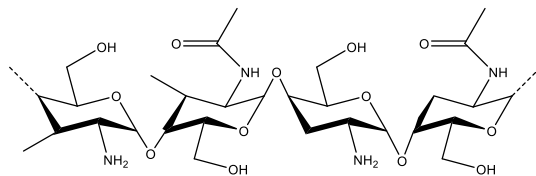


Figura 3 Representación de la estructura del quitosano.

Muchos materiales poliméricos son sintéticos, lo cual compromete su biocompatibilidad y biodegradabilidad en comparación con aquellos polímeros de origen natural como la celulosa, quitina, quitosano y sus derivados. Por tanto, el polímero quitosano ha sido utilizado como material en campos tan diversos como el farmacéutico, médico, la industria alimentaria y la agricultura entre muchas otras (12, 46)

Para el caso de los hidrogeles de quitosano, el grado de entrecruzamiento determinará la capacidad de hinchamiento. Se ha observado que, en su estado hinchado, las propiedades mecánicas del mismo se ven afectadas debido a la gran cantidad de agua que ellos albergan, produciendo que hidrogeles puedan fracturarse con facilidad y por tanto se ven reducidas sus aplicaciones.

3.4 Redes Poliméricas Interpenetradas.

Las redes poliméricas interpenetradas (IPNs) son una combinación de dos o más polímeros que están, al menos parcialmente, entrelazadas en una escala molecular, pero no presentan uniones covalentes entre sí (Figura 2). Esto se realiza con el fin de formar, en la mayoría de los casos, un material que combine las propiedades más relevantes de cada polímero (47, 48). Los IPNs se han sintetizado con la intención de obtener propiedades tales como la resistencia a la tracción, mayor fuerza de impacto y resistencia térmica.

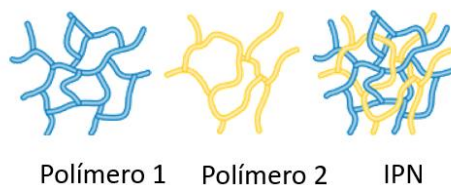


Figura 4: Esquema teórico de la red de polímeros interpenetrantes (IPN).

Los IPN pueden formarse en presencia de un agente entrecruzante para producir una red de polímeros completamente interpenetrados (IPN completo) o, en ausencia de un entrecruzante, para generar una red de polímeros lineales incrustados dentro del hidrogel original (semi - IPN)(49).

Las principales ventajas de las IPN son que se pueden producir matrices de hidrogel relativamente densas que presentan propiedades mecánicas más rígidas y resistentes, propiedades físicas más controlables y, con frecuencia, una carga de fármaco más eficiente en comparación con los hidrogeles convencionales.

Un sistema de administración de medicamentos, además de proteger de una posible degradación, debe estar diseñado para liberar controladamente a un agente terapéutico sensible, así como de mantener su integridad estructural para poder resguardar al agente terapéutico hasta que se libere del sistema (48).

Los tamaños de poros del IPN y la química de la superficie también son las características por controlar para ajustar la cinética de liberación del fármaco, las interacciones entre el hidrogel y los tejidos y las propiedades mecánicas del gel (49).

También se pueden utilizar polímeros con diferentes perfiles de degradación y/o diferentes respuestas de hinchamiento a condiciones fisiológicas para proporcionar múltiples controles sobre las respuestas de hinchamiento de los hidrogeles y, por lo tanto, la cinética potencial de liberación del fármaco (50).

En estudios anteriores se informó sobre el uso de IPN compuestas de quitosano y pHEMA, ambos entrecruzados con glutaraldehído y bis acrilamida para su posible uso en liberación controlada de fármacos. Se observó que el comportamiento de hinchamiento y la liberación del fármaco dependen del pH, su composición, es decir, la proporción relativa de cada una de sus redes y el porcentaje de entrecruzamiento. Los resultados de este estudio indicaron los IPNs a base de esta mezcla son útiles para la liberación controlada del fármacos (4)

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

- Obtener una red polimérica Interpenetrada a base de quitosano y p(HEMA-co-IA) con resistencia mecánica mejorada para su uso como matriz de liberación controlada de fármacos.

4.2 Objetivos específicos.

- Establecer e implementar un diseño de experimentos que permita obtener redes poliméricas interpenetradas a base de quitosano y p(HEMA-co-IA).
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las diferentes redes poliméricas interpenetrantes.
- Caracterizar la carga y liberación de un fármaco prueba a partir de las redes poliméricas interpenetradas que presente las mejores propiedades fisicoquímicas.
- Identificar las aplicaciones de las redes poliméricas interpenetradas en otros campos.

5. METODOLOGÍA.

5.1. Materiales y reactivos.

El quitosano (de bajo peso molecular, Sigma, pureza > 98%), el ácido acético glacial (Ac, 99% pureza Merck), el etanol (grado HPLC, Merck), la lisozima (de la clara de huevo) ≥ 30000 FIP-U/mg cristalino (Merck), el dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (V50, pureza > 98%), el Diacrilato de etilenglicol (Sigma, pureza 99%) y la Genipina (Obtenida por Rodríguez, L. en el proyecto denominado “Extracción a escala semipiloto de genipina a partir de frutos de Genipa americana L29 > 99% de pureza) fueron utilizados tal cual fueron suministrados mientras que el Metacrilato de 2-Hidroxiethyl (HEMA, Sigma, pureza > 98%), se le realizó un proceso de purificación para retirar el inhibidor de radicales libres.

5.2. Síntesis de materiales interpenetrados.

Con el fin de determinar el papel que juega la concentración del copolímero en la carga y liberación del fármaco y en las propiedades mecánicas del material, se realizaron 6 experimentos donde se varía la concentración de la red p(HEMA-co-IA). A su vez, la concentración de los agentes entrecruzantes fue de 3 y 5% para cada red y la concentración de ácido itacónico en el copolímero se mantuvo fija en una relación de un 20% en proporción. La suma total en peso de los monómeros en todos los experimentos fue igual a 1 gramo. La tabla 1 muestra las cantidades utilizadas de cada uno de los experimentos.

La nomenclatura empleada indica las cantidades utilizadas de cada uno de los polímeros, donde Q es la proporción de quitosano y HIA la proporción de p(HEMA-co-IA), al final se indica el porcentaje de entrecruzamiento de cada una de las redes (3 y 5%). Así Q1HIA0.5 5% significa que la proporción entre el quitosano y p(HEMA-co-IA) es 1:0.5 y presentan un 5 % de entrecruzamiento.

Una vez sintetizados los materiales se cortaron en discos de 1 cm de diámetro y se lavaron sumergiéndolos en agua destilada durante aproximadamente 5 días, cambiando varias veces el disolvente, con el fin de retirar cualquier componente de la mezcla de reacción que no

hubiese reaccionado. Luego se dejaron secar durante aproximadamente 5 días a temperatura ambiente y 5 días más a 50°C, hasta alcanzar un peso constante (Xerogel) (6).

Tabla 1: Composición de los hidrogeles IPN de quitosano/p(HEMA-co-IA).

	Quitosano:p(HEMA-co-IA)	Entrecruzamiento (%)	Quitosano (g)	p(HEMA-co-IA) (g)	Genipina (g)	Diacrilato de etilenglicol (g)
Q1HIA0 3%	1:0	3	0.5	0	0.009	N.A
Q1HIA0.5 3%	1:0.5	3	0.5	0.25	0.009	0.0035776
Q1HIA1 3%	1:1	3	0.5	0.5	0.009	0.0071552
Q1HIA0 5%	1:0	5	0.5	0	0.015	N.A
Q1HIA0.5 5%	1:0.5	5	0.5	0.25	0.015	0.0059254
Q1HIA1 5%	1:1	5	0.5	0.5	0.015	0.0118508

5.3. Caracterización fisicoquímica de los materiales

5.3.1. Espectroscopia Infraroja (FTIR).

Para la caracterización de cada material se utilizó un espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet 6700 y pellets de KBr. Los espectros se tomaron en el rango de 4000 a 400 cm⁻¹. Cada material se analizó siguiendo los mismos parámetros.

5.3.2. Cinéticas de hinchamiento a diferentes pH.

Para realizar la cinética de hinchamiento se usaron tres diferentes soluciones que simulaban diversos pHs fisiológicos: solución ácida pH de 1,2 (pH gástrico), solución ácida pH de 4,5 (pH duodeno) y solución pH de 6,8 (pH intestinal). El estudio se realizó a temperatura de 37°C. Las soluciones con los valores de pH usadas son HCl para el pH de 1,2, solución amortiguadora de acetato para pH 4,5 y solución amortiguadora de fosfato para pH 6,8.

Seguidamente se usaron 3 discos para cada pH respectivamente. Los discos se colocaron en recipientes plásticos con aproximadamente 20 mL de las soluciones buffer a los diferentes pH (1,2 - 4,5 - 6,8).

Los discos se pasaron cada 5 minutos durante los primeros 30 minutos, posteriormente se pesaron cada 10 minutos hasta finalizar 2 horas, posteriormente cada 20 minutos hasta completar 5 horas y finalmente se pesaron cada hora hasta completar un total de 8 horas.

El grado de hinchamiento, W , a diferentes tiempos viene definido por la siguiente expresión:

$$W = \frac{m_s - m_d}{m_s} \quad (1)$$

donde m_s y m_d son los pesos de la muestra hinchada y seca, respectivamente. Tres réplicas se utilizaron para cada composición de los distintos hidrogeles y para cada pH, por lo que los resultados de W se expresan como un promedio de las mediciones. Otra forma de representar la cantidad de agua retenida dentro del hidrogel es a través del contenido de agua en el gel, H , que viene definido por la siguiente ecuación:

$$H = \frac{m_s - m_d}{m_d} \quad (2)$$

5.3.3. Degradabilidad.

Los estudios de degradación in vitro se realizaron a 37° C en una solución tampón de fosfato (PBS 0.025M pH 7.4) con 0.01 y 0.1 mg mL⁻¹ de lisozima. Los xerogeles previamente pesados se incubaron a 100 rpm en una solución de lisozima durante 21 días. Las muestras se retiraron del medio cada tres días, se lavaron con agua destilada y se secaron hasta obtener una masa constante. La solución de lisozima se cambió después de cada medición para asegurar que se mantuviera la actividad de la enzima.

5.3.4. Carga y liberación del fármaco.

Las muestras se colocaron en una solución acuosa que contenía el fármaco modelo (25 µg / ml), a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante seis días. Una vez que los hidrogeles se cargaron con el fármaco y alcanzaron el equilibrio de hinchamiento, se secaron a temperatura ambiente hasta lograr una masa constante.

Los estudios de liberación controlada se realizaron a 37°C, utilizando 100 ml de tampón de fosfato 0,1 M a un pH de 7,4. La concentración de fármaco liberada a diferentes tiempos se determinó a 276 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 UV-VIS

5.3.5. Pruebas reológicas.

Las propiedades reológicas de las redes poliméricas fueron evaluadas mediante el reómetro Bohlin Instruments C-VOR de sistema abierto con un gap de aproximadamente 15 mm entre las placas a 25°C. El gap se ajustó dependiendo del grosor de cada material.

Se realizaron dos tipos de análisis. En primer lugar, un experimento de creep-recovery en el cual la deformación del hidrogel fue inducida por la aplicación de una presión de 30 Pa durante 5 min, seguido por una recuperación de 5 min en ausencia de la presión aplicada previamente. El segundo análisis consistió en una relajación de esfuerzos en el que se aplicó un porcentaje de deformación constante del 0.5% a la muestra, donde las variaciones en la presión y el módulo de cizalla (G) fueron determinados. Estas pruebas se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio de ingeniería química de la Universidad Nacional, sede Bogotá.

5.3.6. Análisis estadístico.

Para lograr observar la influencia de la incorporación de pHEMA-co-IA tanto en la resistencia mecánica como en la carga y liberación del componente activo, se debe realizar un diseño factorial multinivel donde las variables continuas serán la proporción de p(HEMA-co-IA) y el grado de entrecruzamiento, el pH, y la concentración de lisozima para la degradación. Las respuestas principales a tener en cuenta serán los módulos elásticos, el hinchamiento en el equilibrio, las constantes de hinchamiento y liberación, la proporción en peso perdido y la concentración máxima de fármaco liberado en un medio acuoso.

El análisis de los datos se llevó a cabo por medio del paquete estadístico Minitab 18. Se realizó un análisis de varianza que permitió la comparación de los resultados obtenidos. Para eliminar posibles datos atípicos se realizó una prueba Q de cada una de las repeticiones.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Síntesis de los materiales generados.

Se obtuvieron satisfactoriamente los materiales interpenetrados Q1HIA0.5 3%, Q1HIA0.5 5%, Q1HIA1 3%, y Q1HIA1 5%, así como lo de los controles Q1HIA0 3% y Q1HIA0 5%, totalmente homogéneos y de una coloración azul oscuro. La consistencia de los materiales fue adecuada, permitiendo su fácil manipulación de la misma forma que los controles.

La formación de la red entre el quitosano y la genipina (material control: Q1HIA0 3 y 5%) ocurre por medio de la reacción de los grupos amino en el quitosano y el carbono β de la genipina (reacción de Michael), dando como resultado un hidrogel de color azul. La consistencia obtenida fue la adecuada, fácilmente manipulables sin sufrir ruptura. La coloración azul de es estos materiales el debida a la reacción generada por la genipina al interaccionar con grupos amino presentes en el quitosano (51)

Los IPNs se prepararon por medio de dos rutas de polimerización diferentes. Para la p(HEMA-co-IA), tanto la copolimerización como el entrecruzamiento ocurrió vía radicales libres, utilizando V50 (2,2-azobis (2-amidinopropano)) como iniciador en una concentración del 1,0% con respecto a la cantidad total de monómeros (anexo 3 y 4). El quitosano, como se mencionó anteriormente, se entrecruzó por medio de una reacción de Michael con la genipina (Anexos 1 y 2).

Los controle antes mencionados fueron sintetizado exitosamente en cajas petri, a diferencia de los IPNs, los cuales fueron sintetizados en un anillo de teflón entre placas de vidrio. Esto fue debido a que se observó en los controles que la reacción no se llevaba a cabo de forma satisfactoria cuando se utilizaban los moldes de vidrio con anillos de teflón (no ocurría cambio de color de amarillo a azul). Para todos los materiales la temperatura empleada durante la síntesis fue de 50°C y se dejaron en el horno por 24 horas.

A medida que se aumentaba la cantidad de p(HEMA-co-IA) en la composición del material se observó una mayor flexibilidad, así como una menor adherencia a las superficies, a diferencia de los controles que fueron mucho más rígidos y algo pegajosos.

También cabe notar que al momento de los lavados realizados a los materiales se observó una mayor capacidad de hinchamiento y una mayor flexibilidad en este estado de los materiales interpenetrados en comparación de los controles Q1HIA0 3 y 5%.

6.2. Caracterización fisicoquímica de los materiales.

6.2.1. Espectroscopia Infrarroja (FTIR).

Para comprobar la formación de las redes se tomaron espectros de FT-IR a los monómeros y se compararon con los espectros de los materiales entrecruzados.

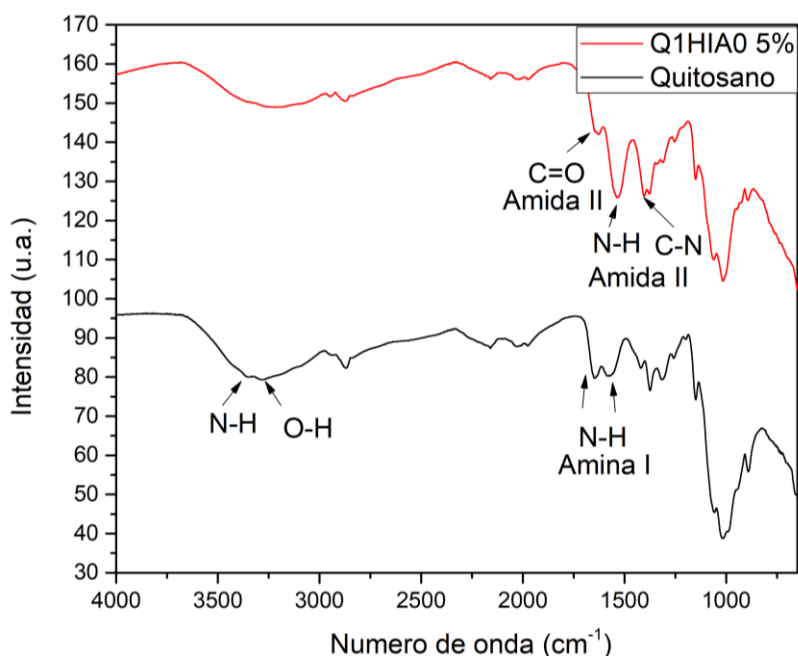


Figura 5: FTIR de quitosano comparado con el espectro hidrogel control Q1HIA0 5%.

En la Figura 5, el espectro del quitosano muestra una banda ancha a 3283 cm^{-1} que corresponde al estiramiento de los grupos hidroxilo, provenientes del agua y los hidroxilos presentes en el anillo de glucosa, de la misma manera a 3449 cm^{-1} la cual corresponde al estiramiento del enlace N-H. Las absorbancias en 1650 cm^{-1} y 1560 cm^{-1} corresponden a la deformación por flexión del enlace N-H de las aminas primarias (52) (Lambert, 1987). La banda de los enlaces glucosídicos se observa a 1075 cm^{-1} (C-O-C), y el enlace N-C a 1025 cm^{-1} (N-C) (53).

El entrecruzamiento del quitosano con genipina implica un ataque nucleofílico del grupo amino del polímero sobre el átomo de carbono olefínico en C-3 de genipina, que da como

resultado la apertura del anillo de dihidropirano y la formación de una amina terciaria, es decir, un derivado de genipina unido a una unidad de glucosamina (anexo 5) (52). La posterior reacción, más lenta, es la formación de una amida a través de la reacción del grupo amino del quitosano con el grupo éster (por C-11) de la genipina (Anexo 4) (52).

Después del entrecruzamiento con genipina (Figura 5), a 1537 cm^{-1} aparece una banda que indica la deformación de NH presente en una amida secundaria, la cual es el resultado de la reacción entre el éster de genipina y los grupos amino del quitosano. La banda a 1624 cm^{-1} se atribuyó al estiramiento de C=O de amidas secundarias (52). Además, el aumento observado en la banda alrededor de 1403 cm^{-1} puede ser interpretada como la vibración de estiramiento del enlace C-N, más numerosas después del entrecruzamiento con genipina. Con esto se concluye que la formación del entrecruzamiento del quitosano con genipina se llevó a cabo de forma satisfactoria.

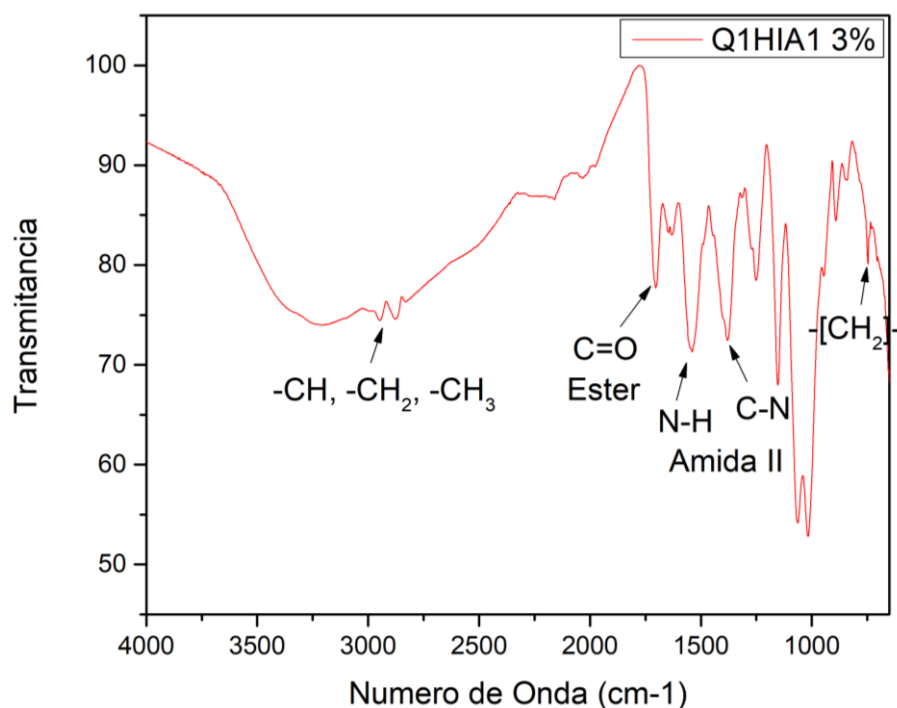


Figura 6: Muestra de espectro infrarrojo de los materiales interpenetrados.

El espectro del material interpenetrado Q1HIA1 3% presentado en la Fig. 6, revela la banda de vibración de estiramiento de C=O del grupo éster a 1704 cm^{-1} , y una banda de absorción con un hombro débil alrededor de 2947 cm^{-1} , que corresponde al estiramiento de los grupos

alifáticos $-\text{CH}_2-$, $-\text{C}-\text{H}$ y $-\text{CH}_3$, especialmente (54). El aumento de la intensidad máxima del grupo $\text{C}=\text{O}$ a 1704 cm^{-1} en el espectro de p(HEMA-co-IA) se asoció con la presencia de los grupos $\text{C}=\text{O}$ adicionales del ácido itacónico. Por otro lado, aparecieron varias bandas en la región de huellas dactilares para unidades de etilenglicol, originadas a partir del componente DEGDMA, entre 1600 y 1000 cm^{-1} (

Se observa también una banda aproximadamente a 849 cm^{-1} que nos indica la formación de una cadena alifática ($-\text{[CH}_2\text{]}_n-$) característica de los polímeros metacrílicos (54). Con estas dos bandas podemos garantizar que el entrecruzamiento, tanto para quitosano como para p(HEMA-co-IA) , se ha generado en los materiales interpenetrados (figura 6).

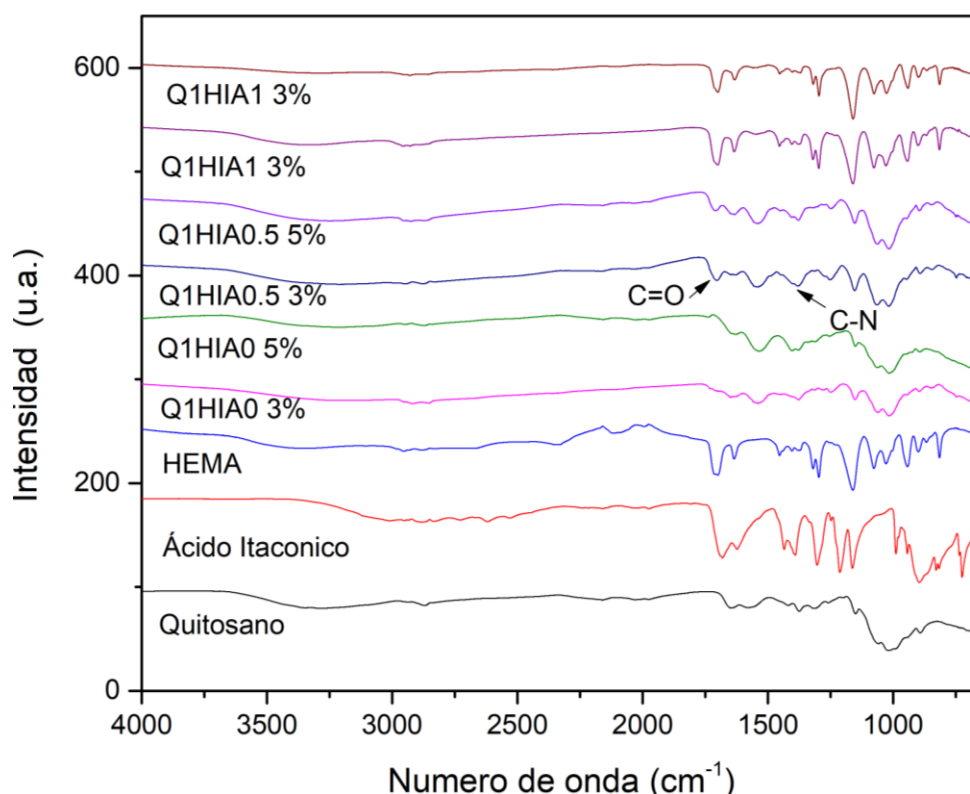


Figura 7: FTIR de todos los materiales: Quitosano (línea negra), ácido itacónico (línea roja); HEMA (línea azul claro); Q1HIA0 3% (línea fucsia); Q1HIA0 5% (línea verde), Q1HIA0.5 3% (línea azul oscuro), Q1HIA0.5 5% (línea morada claro), Q1HIA1 3% (línea morada) y Q1HIA1 5% (línea vino tinto).

La figura 7 muestra la comparación de espectros de los materiales sintetizados con respecto a los controles. Se observa una atenuación de la banda característica del carbonilo proveniente del éster y de la amida secundaria a medida que el entrecruzamiento de quitosano aumenta en la composición de los materiales. De la misma manera, la intensidad de la banda correspondiente a la formación de la cadena alifática y la señal de carbonilo, provenientes del copolímero, aumenta con la concentración de p(HEMA-co-IA) en la composición de los materiales. De esto cabe aclarar que los resultados de los espectros infrarrojos no son cuantitativos pues no siguen la ley de Beer.

De esta observación se concluye que los materiales si se formaron con las condiciones de reacción utilizadas en este proyecto. De la misma manera, cabe resaltar que no hubo interferencia por parte de los distintos mecanismos de reacción y entrecruzamiento de las redes en la polimerización de estos.

6.2.2. Cinéticas de Hinchamiento a diferentes pH.

Se estudió el comportamiento de hinchamiento en relación con la composición del IPN utilizando los xerogeles con diferentes proporciones de las redes quitosano/p(HEMA-co-IA). Todos ellos con niveles de entrecruzamiento (3 y 5 %). Las dimensiones iniciales de los xerogeles fueron en promedio de $1,00 \pm 0,2$ mm de espesor y $5,00 \pm 0,1$ mm de diámetro.

La relación de hinchamiento a cada tiempo, W , se calculó a partir de la ecuación (1) de la parte experimental. En la Figura 8 se presentan las curvas de la relación de hinchamientos para todos los materiales a pH 1.2, 4,5 y 6.8.

El grado de hinchamiento máximo en el equilibrio, W_{∞} , representa la característica más relevante de los materiales, ya que tiene mayor influencia sobre la biocompatibilidad, permeabilidad y difusión del material, así como sobre la capacidad de carga de este. Pero a su vez, si estos parámetros tienen valores muy altos, producirán consecuencias negativas sobre las propiedades mecánicas del material.

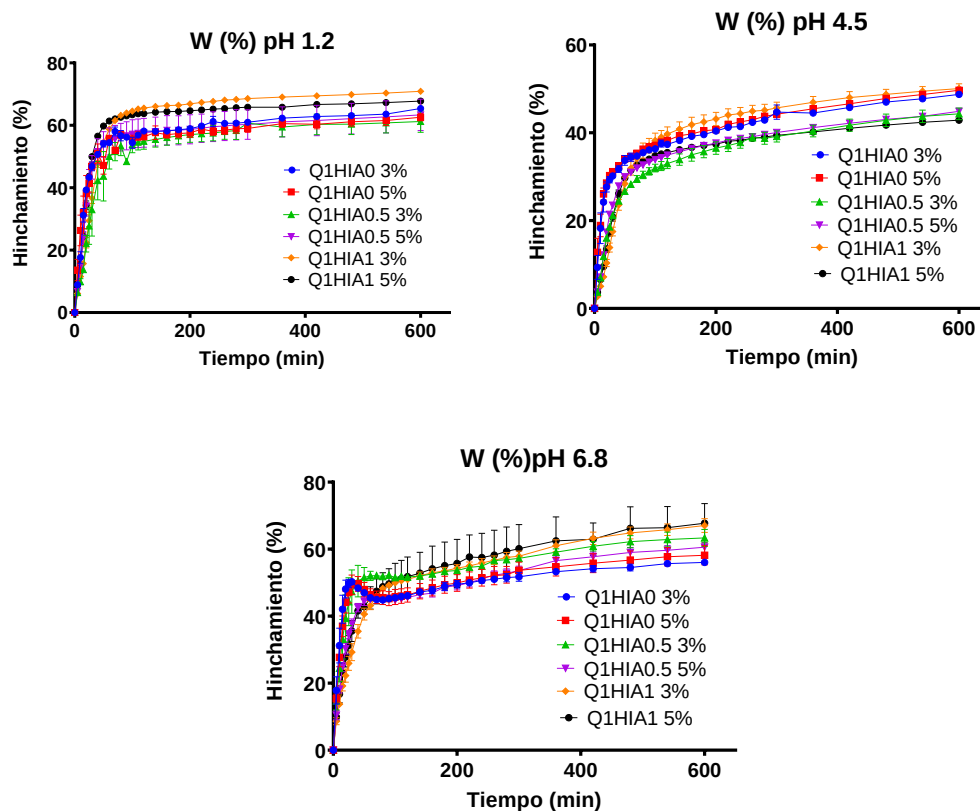


Figura 8: curva de hinchamiento en los tres pH para todos los materiales: A. pH 1.2, B. pH 4.5, C. pH 6.8.

Como se pudo evidenciar en la gráfica anterior, el pH de la solución está directamente relacionado con la capacidad final de hinchamiento de los materiales estudiados, donde a pH 1.2 se observó el mayor hinchamiento y a pH 4.5 el menor. Los niveles de entrecruzamiento también presentaron influencia sobre el hinchamiento final de los materiales, donde la captación de agua es menor cuando el entrecruzamiento es mayor.

Lo anterior es debido a la presencia de grupos amino libres en el quitosano, concentración de ácido itacónico, así como el grado de entrecruzamiento que tiene en la red polimérica. Por lo general la fase amorfa inicia el hinchamiento, permitiendo que solvente penetren la red del hidrogel. A su vez, la fase vítrea genera una restricción a la expansión de la red impidiendo la entrada de solvente al hidrogel. Si la entrada de solvente es muy rápida en relación a la expansión de la red, podría ocurrir un pico de hinchamiento y luego una relajación de las redes, liberando solvente hasta llegar a un equilibrio osmótico (55).

Cuando el quitosano se encuentra en medio ácidos, las aminas presentes en su estructura son protonadas ($-\text{NH}_3^+$), generando un polímero con carga positiva a lo largo de su cadena (polielectrolito). Estas generan la repulsión electrostática de las cadenas permitiendo una mejor captación de agua (50). En comparación, a pH básico, el quitosano se encuentra neutro ($-\text{NH}_2$), mientras que el ácido itacónico tendrá sus dos ácidos desprotonados ($-\text{COO}^-$), ayudando a la relación de hinchamiento. A pesar de que estén presentes los carboxilatos en el material interpenetrado, la repulsión de las cadenas generada es muy baja ya que la concentración de ácido itacónico en la red es menor al 20%, limitando así el hinchamiento del material. Lo anterior es evidenciado a pH 6.8 donde la relación de hinchamiento de los materiales estudiados varía muy poco. Con respecto al nivel de entrecruzamiento, entre más puentes tengan las cadenas poliméricas más pequeño será el tamaño de poro, limitando la captación de agua dentro de la red.

El ácido itacónico (IA) tiene dos grupos carboxilo con diferentes valores de pKa ($\text{pKa}_1 = 3,85$ y $\text{pKa}_2 = 5,45$), por lo que cantidades muy pequeñas de IA producen una buena respuesta al pH y aumentan el grado de hinchamiento del hidrogel donde es integrado. La incorporación de un ácido carboxílico a un polímero puede contribuir a la formación de enlaces de hidrógeno y puede aumentar la resistencia mecánica de las redes poliméricas interpenetradas (56, 57).

Teniendo en cuenta que el proceso de hinchamiento está dirigido por interacciones dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno entre el agua y los grupos funcionales de los monómeros, el aumento en el contenido de copolímero en las composiciones condujo a un aumento en la relación de hinchamiento en el equilibrio en general para todos los materiales en los 3 pHs, indicando una relación directa entre la composición y la capacidad final de hinchamiento. Es sabido que una alta concentración de grupos iónicos cargados dentro de un hidrogel aumenta el porcentaje de hinchamiento debido a la osmosis y la repulsión entre las cargas (50).

Si se considera una cinética de segundo orden, se encuentra que la ecuación para el hinchamiento a cualquier tiempo (t) es (55):

$$\frac{dW}{dt} = K(W_{\text{max}} - W)^2 \quad (3)$$

Que al integrar se obtiene:

$$W = \frac{KW_{\max}^2 t}{1 + KW_{\max}^2 t} \quad (4)$$

Si la ecuación (6) se divide por $KW_{\max}^2 W$ y se factoriza se obtiene:

$$t/W = 1/KW_{\max}^2 + (1/W_{\max}^2)t \quad (5)$$

Suponiendo que $A = 1/KW_{\max}^2$ y $B = 1/W_{\max}^2$, la ecuación (5) se puede simplificar de la siguiente manera:

$$t/W = A + (B)t \quad (6)$$

En una cinética de hinchamiento de segundo orden la velocidad de hinchamiento es directamente proporcional al cuadrado de la capacidad de hinchamiento disponible ($W_{\max} - W$), siendo W el hinchamiento del hidrogel a tiempo t .

Por medio del análisis de regresión lineal se observó que para todos los hidrogeles el resultado fue similar y sus coeficientes de correlación fueron superiores al 99%, indicando que se ajustan a una cinética de segundo orden durante el periodo de tiempo estudiado. La Figura 9 muestra las regresiones lineales de los 6 materiales en todos los pH las cuales se obtuvieron aplicando la ecuación (6).

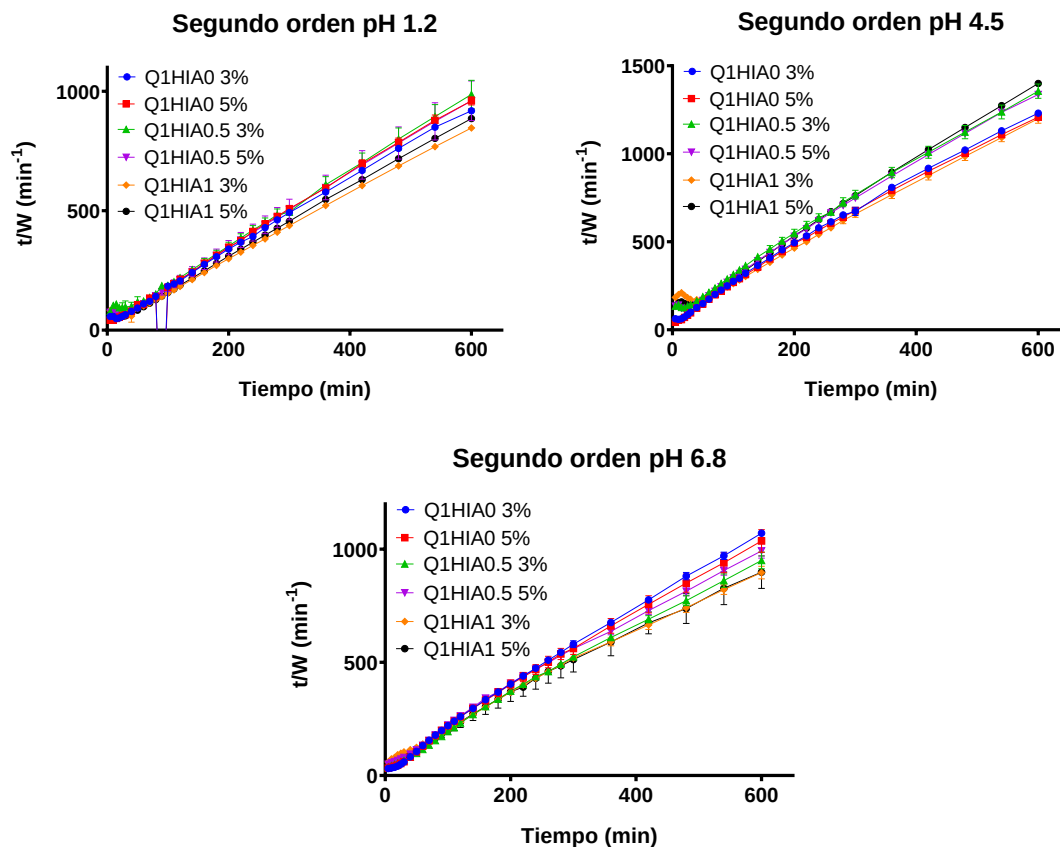


Figura 9: curvas de hinchamiento transformadas a una cinética de segundo orden para todos los materiales en los 3 pH estudiados.

La Tabla 2 resume las propiedades de hinchamiento para los materiales sintetizados en los tres pH. En ella se observa como el contenido de agua en equilibrio, W_{∞} , varia a medida que lo hace el copolímero en su composición.

Tabla 2: Nivel de equilibrio de hinchamiento en el infinito (W_{∞}) y constantes cinéticas de segundo orden (k) para todos los materiales en los tres pHs estudiados.

Materials	pH 1.2			pH 4.5			pH 6.8		
	W_{∞} (%)	$K(\text{min}^{-1})$	R^2	W_{∞} (%)	$K(\text{min}^{-1})$	R^2	W_{∞} (%)	$K(\text{min}^{-1})$	R^2
Q1HIA0 3%	88.25	0.0466	0.9987	89.27	0.02055	0.9959	60.71	0.09176	0.9969
Q1HIA0 5%	83.30	0.06020	0.9994	86.11	0.02321	0.9954	69.66	0.05945	0.9958
Q1HIA0.5 3%	90.56	0.02590	0.9964	94.34	0.01111	0.9975	60.85	0.07777	0.9964
Q1HIA0.5 5%	89.77	0.04312	0.9980	93.87	0.01327	0.9971	67.45	0.04192	0.9943
Q1HIA1 3%	90.23	0.03344	0.9937	94.87	0.00967	0.9900	63.86	0.038678	0.9966
Q1HIA1 5%	87.22	0.05933	0.9982	92.43	0.01363	0.9971	66.99	0.04034	0.9961

En cinéticas de hinchamiento, la constante de velocidad de hinchamiento, K , es la que cuantifica la rata de hinchamiento de los materiales. Aquí K depende del tiempo de hinchamiento y de la capacidad del material a absorber agua o solvente de hinchamiento (55). Extrapolando lo mencionado con anterioridad a los resultados obtenidos en esta cinética, no se observa una dependencia de la concentración de las redes en la velocidad de hinchamiento en los materiales en los pH estudiados.

Cabe mencionar que los materiales que presentaron un valor más alto de K representan una entrada de solvente más rápida en la primera etapa de hinchamiento. A medida que pasa tiempo, el hinchamiento de los materiales se encuentra dirigido por la pH-sensibilidad presente en los materiales y no por esta constante (58).

Para evaluar la influencia de las interacciones de los factores de respuesta (K de hinchamiento y W_{inf}) con los factores (pH y Composición); se realizó un diseño factorial donde se comparaban la composición y pH como factores principales que afectan las variables de respuesta, que para el caso de la liberación fueron la constante cinética de hinchamiento y la relación de hinchamiento en el infinito por cada material.

Analizando los resultados obtenidos del diseño se observó que el pH y la composición presentan efecto sobre la constante de hinchamiento de los materiales y también sobre la

capacidad final de absorber agua (valor $p = 0.000$). Lo anterior es confirmado en el diagrama de Pareto obtenida de la regresión factorial general. Figura 10

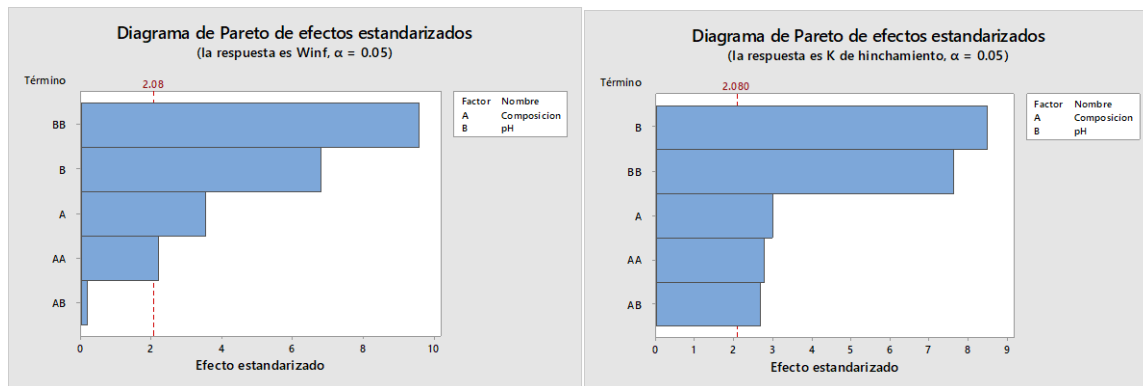


Figura 10: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la capacidad de hinchamiento máxima y la constante de hinchamiento.

6.2.3. Comportamiento reológico.

Se realizó un análisis de fluencia y recuperación y relajación de esfuerzos para todos los materiales sintetizados. En este tipo de experimentos, una torsión constante es aplicada a la muestra y la deformación resultante se mide en función del tiempo.

La figura 11 muestra que el comportamiento de los materiales estudiados es viscoelástico, predominantemente elástico. La fluencia del material es poca ya que se observa una pendiente muy baja hasta completar 300 segundos cuando la presión ejercida al material es liberada.

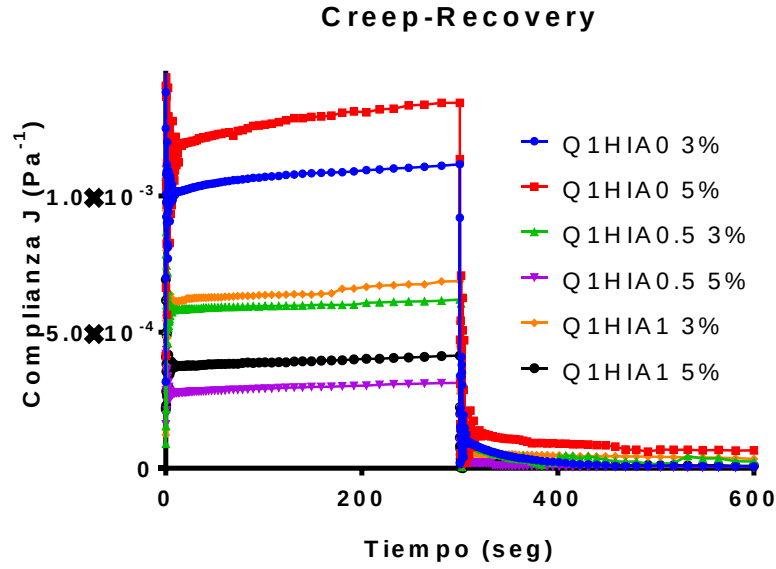


Figura 11: Análisis de recuperación de fluencia para los materiales sintetizados.

Comparando los resultados obtenidos entre los materiales se observa que no hubo una mejoría en la capacidad de deformación y fluencia de los materiales cuando se adiciona el copolímero en la composición, además, el aumento de la relación de copolímero no afectó significativamente la resistencia del material, lo cual se evidencia en la gráfica anterior (figura 11). Cabe resaltar que el aumento del porcentaje de entrecruzamiento si presenta un efecto significativo, donde a mayor entrecruzamiento, mayor resistencia a fluir y deformarse, mostrando un menor valor de complianza para estos casos (Tabla 3).

Los datos de creep se analizaron de acuerdo con el modelo de Burger (ecuación 10) que consta de una unidad de Maxwell y una unidad de Kelvin-Voigt (4, 59, 60).

$$J(t) = \frac{1}{G_0} + \frac{t}{\eta_0} + \frac{1}{G_1} [1 - \exp\left(\frac{-tG_1}{\eta_1}\right)] \quad (10)$$

$J(t)$ representa la complianza general en cualquier tiempo t , G_0 es el módulo elástico instantáneo de la unidad de Maxwell y G_1 es el módulo elástico de la unidad de Kelvin-Voigt (4, 60, 61). Esta última representa las contribuciones de la región elástica a la complianza total. El amortiguador del elemento de Maxwell representa la viscosidad residual, η_0 , y el amortiguador asociado con Kelvin-Voigt se denomina viscosidad interna, η_1 . Por otra parte, la región de viscoelasticidad lineal se ajusta a la ecuación (11) (59), y cuando se alcanza un

estado de equilibrio, en la mayoría de los casos se reduce a la ecuación (12). La Ecuación (12) se utiliza para determinar la deformación por creep en estado estacionario (59, 60).

$$J(t) = J_0^e + \frac{t}{\eta_0} \quad (11)$$

$$J_0^e = \frac{1}{G_0} + \frac{1}{G_1} \quad (12)$$

Los valores experimentales de J (Pa^{-1}) en el proceso de recuperación se ajustaron a la ecuación (13):

$$J(t) = J^\infty + J_{kv} \exp(-Bt^C) \quad (13)$$

Donde B y C son parámetros que definen la tasa de recuperación del sistema, J^∞ es la complianza residual, J_{kv} es la complianza máxima del elemento Kelvin-Voigt, y t es el tiempo. La ecuación (13) se cumple con las siguientes condiciones(62-64):

- 1) Cuando $t \rightarrow 0$, $J(t)$ es igual a $J^\infty + J_{kv}$, que corresponde a la deformación máxima de los amortiguadores en el modelo de Burger con recuperación instantánea.
- 2) Para $t \rightarrow \infty$, $J(t)$ es igual a J^∞ , que proporciona la deformación residual del sistema correspondiente al desplazamiento irreversible del amortiguador de Maxwell.

Adicionalmente, la deformación del resorte de Maxwell (J_0^e), se obtiene mediante el uso de la ecuación (14), donde $J_{\max}$ es la deformación máxima correspondiente al valor de complianza experimental para el tiempo más largo (300 s).

$$J_0^e = J_{\max} + (J^\infty + J_{kv}) \quad (14)$$

Por último, es posible calcular los porcentajes de deformación ($S\%$) y de recuperación ($R\%$) de cada elemento del modelo de Burger utilizando las siguientes expresiones:

$$S = \left(J_{\text{elemento}} / J_{\max} \right) * 100 \quad (15)$$

$$R = \left([J_{\max} - J^\infty] / J_{\max} \right) * 100 \quad (16)$$

La complianza ($J(t)$), el porcentaje de deformación ($S\%$) y el porcentaje total de recuperación ($R\%$) obtenido para cada uno de los elementos del modelo de Burger se presentan en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

Tabla 3: Viscosidad residual (η_0) y valores de complianza (J_{oe} , J_{max} , J_{∞} , J_{kv}) para los diferentes materiales sintetizados.

Materiales	η_0 (10^6 Pa.s)	J_{oe} (10^{-5} Pa^{-1})	J_{max} (10^{-5} Pa^{-1})	J_{∞} (10^{-5} Pa^{-1})	J_{kv} (10^{-5} Pa^{-1})
Q1HIA0 3%	2.833	102.400	111.597	0.684	8.513
Q1HIA0 5%	1.701	119.100	134.200	6.611	8.489
Q1HIA0.5 3%	8.711	58.310	61.965	2.534	1.122
Q1HIA0.5 5%	7.530	27.760	31.435	0.178	3.497
Q1HIA1 3%	4.228	61.350	68.740	3.425	3.965
Q1HIA1 5%	7.616	37.440	41.360	0.907	3.013

Tabla 4: Porcentajes de deformación ($S\%$) y recuperación ($R\%$) para cada elemento de complianza de los diferentes materiales sintetizados

Materiales	Deformación, S (%)			Recuperación, R (%)
	J_{oe} / J_{max}	J_{∞} / J_{max}	J_{kv} / J_{max}	
Q1HIA0 3%	91.76	0.61	7.63	99.39
Q1HIA0 5%	88.75	4.93	6.33	95.07
Q1HIA0.5 3%	94.10	4.09	1.81	95.91
Q1HIA0.5 5%	88.31	0.57	11.12	99.43
Q1HIA1 3%	89.25	4.98	5.77	95.02
Q1HIA1 5%	90.52	2.19	7.28	97.81

Los resultados anteriores muestran que la viscosidad residual (η_0) para los controles (Q1HIA0 3% y 5%) es menor que para los otros materiales IPNs, lo cual indica una menor resistencia a la deformación. Estos hidrogeles se deforman y fluye más fácilmente cuando se aplica tensión a la muestra en comparación a los materiales interpenetrados sintetizados. A pesar de ello, los materiales Q1HIA0 3% y 5% se recuperan casi en su totalidad (99% y 95% respectivamente), indicando que la deformación fue predominantemente elástica, donde no

ocurrió ruptura de enlaces ni de microestructuras generadas por enmarañamiento de las cadenas poliméricas (59).

Los materiales interpenetrados presentaron una menor deformación instantánea comparado con los controles, la cual puede ser debida a la densidad de polímero por unidad de volumen, donde, la presencia de otra red polimérica disminuye los grados de libertad que pueden tener las cadenas libres, limitando por tanto su deformación final. Es importante resaltar que a pesar de que su deformación elástica es menor, el componente viscoso de la deformación (J_{kv} / J_{max}) no presenta diferencia significativa con los controles, sugiriendo una mayor resistencia a la tensión por parte de los materiales interpenetrados. A su vez, la incorporación de un ácido carboxílico a un polímero puede contribuir a la formación de enlaces de hidrógeno y puede aumentar la resistencia mecánica de las redes poliméricas interpenetradas (56, 57).

Por otro lado, se observa que el aumento de la relación de p(HEMA-co-IA) no cambió de manera significativa la capacidad del IPN de resistir una tensión, donde la disminución de la deformación es muy poca entre 1:0.5 y 1:1. La rigidez de las cadenas de quitosano depende principalmente del contenido de grupos acetilo y del peso molecular del mismo. De la misma manera, debido a la combinación de los efectos estéricos de los grupos acetilo y la repulsión debida a los grupos amino protonados, la rigidez de las cadenas aumenta (65).

La temperatura a la cual tiene lugar la deformación plástica de un material polimérico es también factor importante para la determinación de la velocidad de fluencia (61, 66). A temperaturas por debajo de la T_g , la velocidad es relativamente baja debido a la movilidad restringida de las cadenas del polímero. Por el contrario, arriba de la T_g , los polímeros se deforman con más facilidad por una combinación de deformación elástica y plástica (61). Los análisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25°C), por tanto, la movilidad de las cadenas del polímero es limitado, produciendo una disminución de la fluencia de los materiales.

En los análisis de relajación de esfuerzos realizados a los materiales se evidencia que el módulo de cizalla (G) disminuye gradualmente a medida que pasa el tiempo cuando la deformación constante de 5% se mantiene. Esto indica que el componente elástico de los materiales se desgasta con el tiempo (60). La causa de esta relajación es debida a la inducción

de un flujo viscoso no recuperable en la estructura interna del material debido a deslizamientos de las cadenas poliméricas, así como por la ruptura y deformación de los enlaces secundarios entre las cadenas (4, 60, 61).

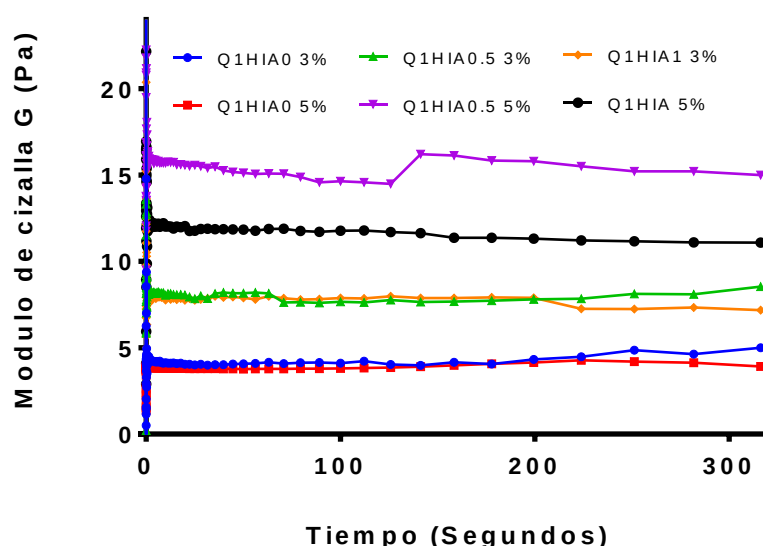


Figura 12: Análisis de relajación de la tensión en deformaciones de 5% para los materiales interpenetrados:

Cabe resaltar que los controles presentaron menores módulos de cizalla que los materiales interpenetrados. Esto es debido a la rigidez aportada por parte del enmarañamiento de las cadenas poliméricas en los materiales. Un valor de módulo de cizalla grande indica que un sólido es altamente rígido, en otras palabras, se requiere una gran fuerza para producir deformación; mientras que un valor pequeño para este módulo indica que un sólido es blando o flexible, por lo que se necesita poca fuerza para deformarlo.

Cabe mencionar que a medida que aumenta el nivel de entrecruzamiento en los materiales interpenetrados el decaimiento en el valor del módulo de cizalla aumenta, indicando una menor fluidez y elasticidad. El decaimiento en el módulo también podría ser debido a la generación de microfisuras en los materiales debido a la presión ejercida, esto indica rigidez del material y poca fluidez de estos. También cabe resaltar que debido a que se trabaja debajo de su temperatura de transición vítrea, los polímeros presentaron una estructura predominantemente cristalina, lo cual limitara su fluidez.

6.2.4. Estudios de biodegradación enzimática.

La Figura 12 muestra la degradación de todos los materiales bajo condiciones fisiológicas simuladas a dos concentraciones de lisozima. La Eq. (17) fue utilizada para determinar la proporción de degradación por medio del peso seco de los xerogeles antes y después de someterlos al proceso de degradación con lisozima.

$$\text{Proporcion peso seco (\%)} = \frac{X_d}{X_o} * 100 \quad (17)$$

Donde X_0 es el peso inicial del xerogel y X_d es el peso del xerogel a determinado tiempo de degradación (67, 68).

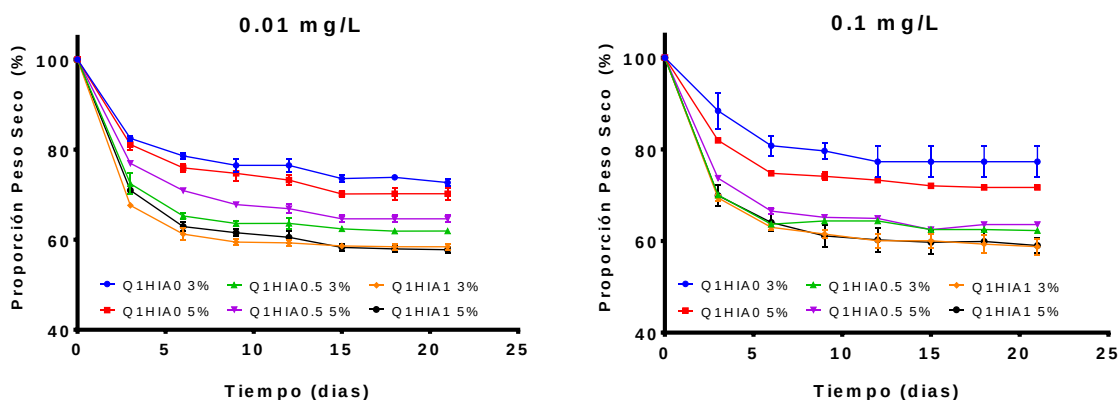


Figura 13: Dependencia del tiempo de la proporción del peso seco restante de los materiales en 0,01 mg ml⁻¹ y 0,1 mg ml⁻¹ de lisozima en un buffer de acetato pH 7,4 a 37°C

Como se observa en la figura 13 la degradación varía entre el 85 y 75% para los controles y entre 75 y 60% para los materiales interpenetrados en las dos concentraciones de lisozima utilizadas, mostrando una tendencia mayor de degradación a medida que aumenta la concentración del copolímero en el material.

Con los datos obtenidos se realizó un diseño factorial de múltiples niveles, con 4 factores, tres réplicas y 216 corridas. (Anexo 7). Observando los resultados obtenidos se concluye que los factores que presentaron mayor influencia sobre la degradación fueron el tiempo y la

composición de los materiales y no la concentración de lisozima ni el porcentaje de entrecruzamiento.

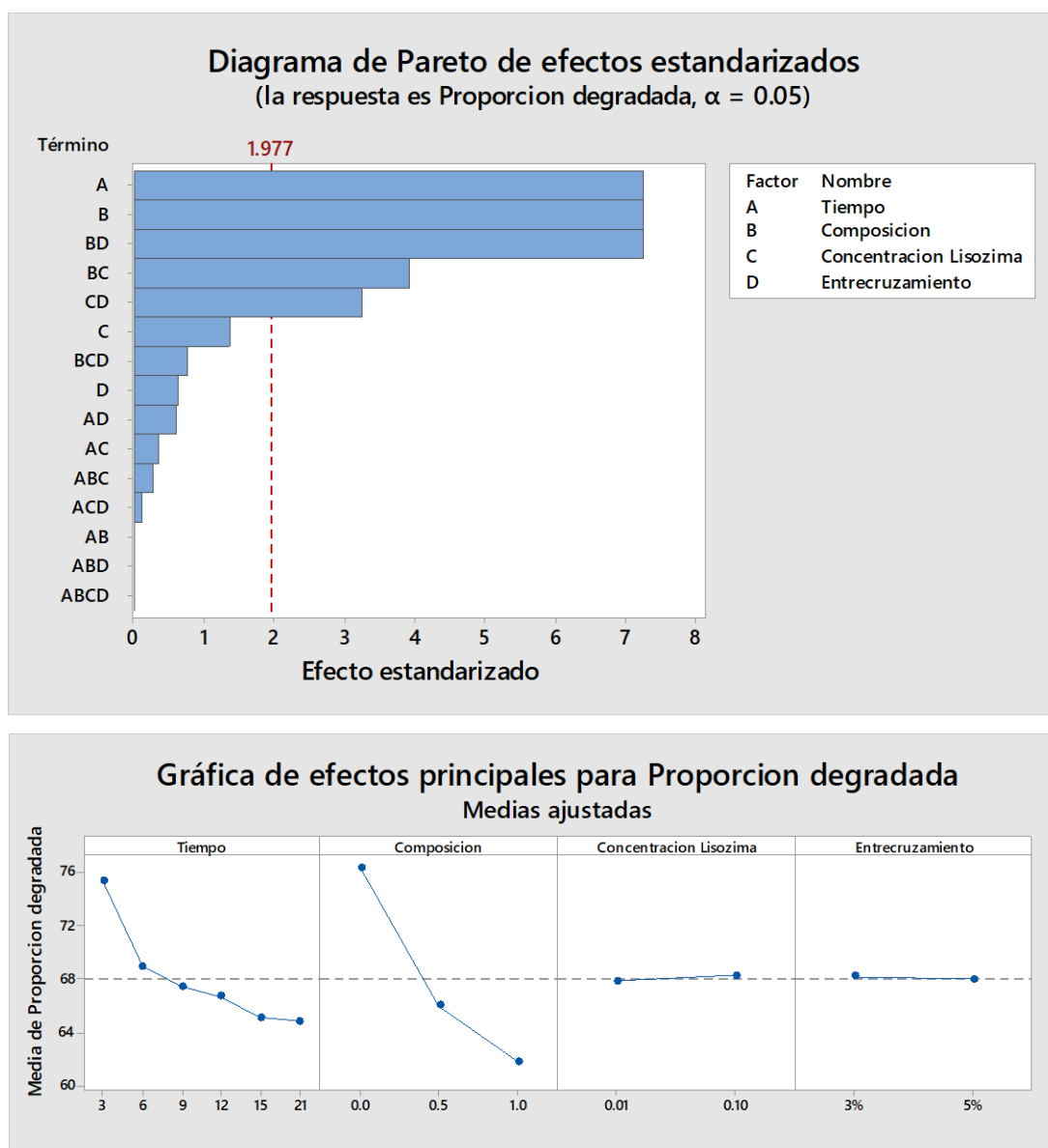


Figura 14: Diagrama de Pareto y Gráfico de interacción de los cuatro factores principales.

La Figura 14 fue realizada con el fin de observar el efecto de cada factor sobre el peso de los materiales poliméricos y su degradación, en ella se confirma nuevamente que la concentración de lisozima y el porcentaje de entrecruzamiento no tiene efecto sobre su degradación. (Figura 13).

En cuanto al efecto de la composición del material sobre la degradación, se observó que la degradación aumento a medida que lo hizo la concentración del copolímero, esto puede ser debido a un mayor hinchamiento por parte de los materiales interpenetrados en comparación con los controles, donde al aumentar la cantidad de grupos ionizables en un pH básico (como 7.4) se lograra mayor hinchamiento y por tanto mayor concentración de lisozima dentro del material. Otra posible explicación a lo acontecido es que entre mayor es la proporción de quitosano en el material, mayor es la concentración de enzima necesaria para la degradación y por tanto el peso del material es mayor.

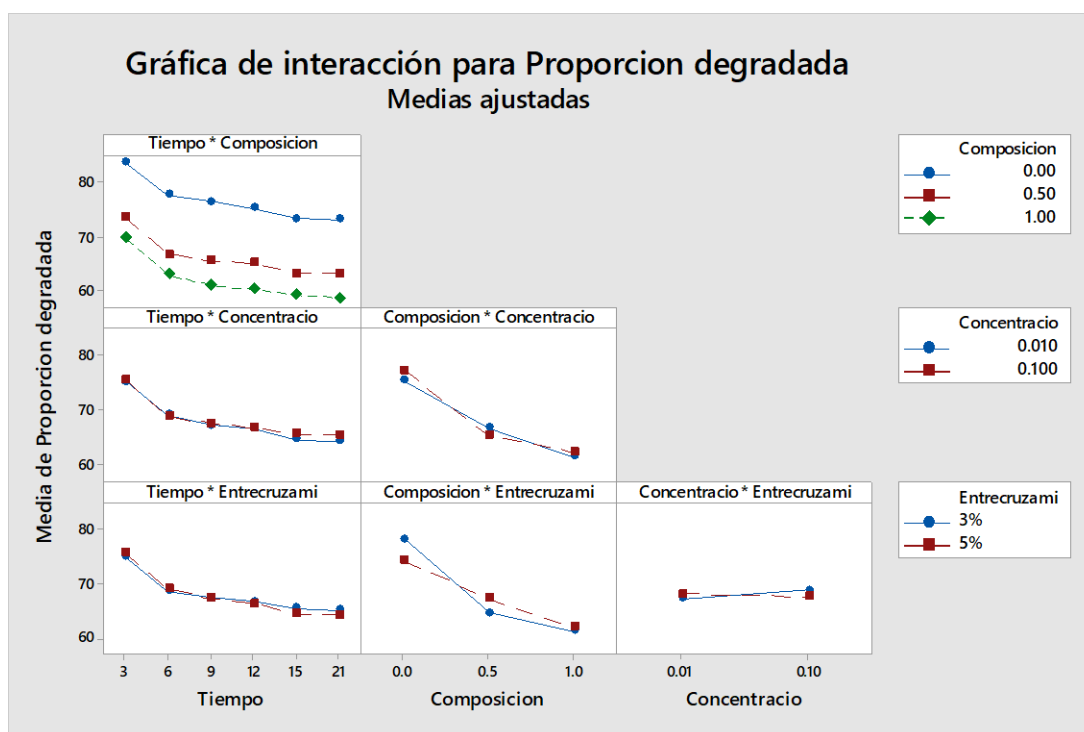


Figura 15: Gráfico de interacción de los cuatro factores principales.

También, cabe resaltar que se encontró influencia estadísticamente significativa de la interacción entre la composición de los materiales y la concentración de la lisozima, así como la interacción entre la composición y el entrecruzamiento sobre la degradación, donde a medida que aumentaba la concentración del copolímero en la composición del material se observó una mayor degradación en ambos casos.

Los materiales control posiblemente presentaron menor degradación con respecto a los demás materiales puesto que es posible que los IPN's al contener otro polímero en su

estructura p(HEMA-co-IA), aumentan su capacidad de hinchamiento, generando que mayor cantidad de solución enzimática entre a la matriz y pueda degradarla en un mayor porcentaje.

Estos resultados demuestran la degradabilidad de los materiales en condiciones fisiológicas. Al contener una mayor proporción de copolímero puede hincharse con mayor facilidad, lo que se observa como un aumento en el volumen de los IPN's, logrando de tal forma que se degrade de manera drástica el material, además, no se logró observar diferencia significativa entre las concentraciones de lisozima utilizadas.

6.2.5. Cinéticas de liberación de Diclofenaco sódico.

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de los materiales durante la liberación de un fármaco es necesario simular los diferentes pHs que se encuentran en el cuerpo debido a que tanto el quitosano como el p(HEMA-co-IA) son sensibles a los cambios de pH del medio de hinchamiento. Por lo anterior se realizaron las cinéticas de liberación en pH 1.2, 4.5 y 6.8.

Se realizó una curva de calibración con el estándar del diclofenaco para lo cual se empleó una solución madre de 20 ppm en agua destilada, a partir de la cual se realizaron diluciones para obtener concentraciones desde 0.5 ppm hasta 15 ppm (Anexo 15), de la cual se obtuvo la ecuación de la recta (**Eq 7**), con un coeficiente de determinación alto, que indica que el modelo explica el comportamiento de la absorbancia y que esta es dependiente de la concentración de las muestras en un 99,99%,

$$Abs = 0.03417[Concentración (ppm)] - 0,008013 \quad (7)$$

$$[Concentración (ppm)] = \frac{Abs + 0,008013}{0.03417} \quad (8)$$

además, el valor P de 0,000; menor a la significancia del 5%, indica que el modelo se ajusta adecuadamente a los datos obtenidos.

Para determinar la longitud de onda óptima para cuantificar el diclofenaco se realizó un barrido de longitudes de onda y se observó que a 276 nm presentaba la mayor absorción. Se obtuvieron absorbancias a cada pH, los cuales se tomaron por triplicado en cada tiempo

Con los datos obtenidos anteriormente se realizaron extrapolaciones para determinar las concentraciones correspondientes a cada tiempo (Figura 15):

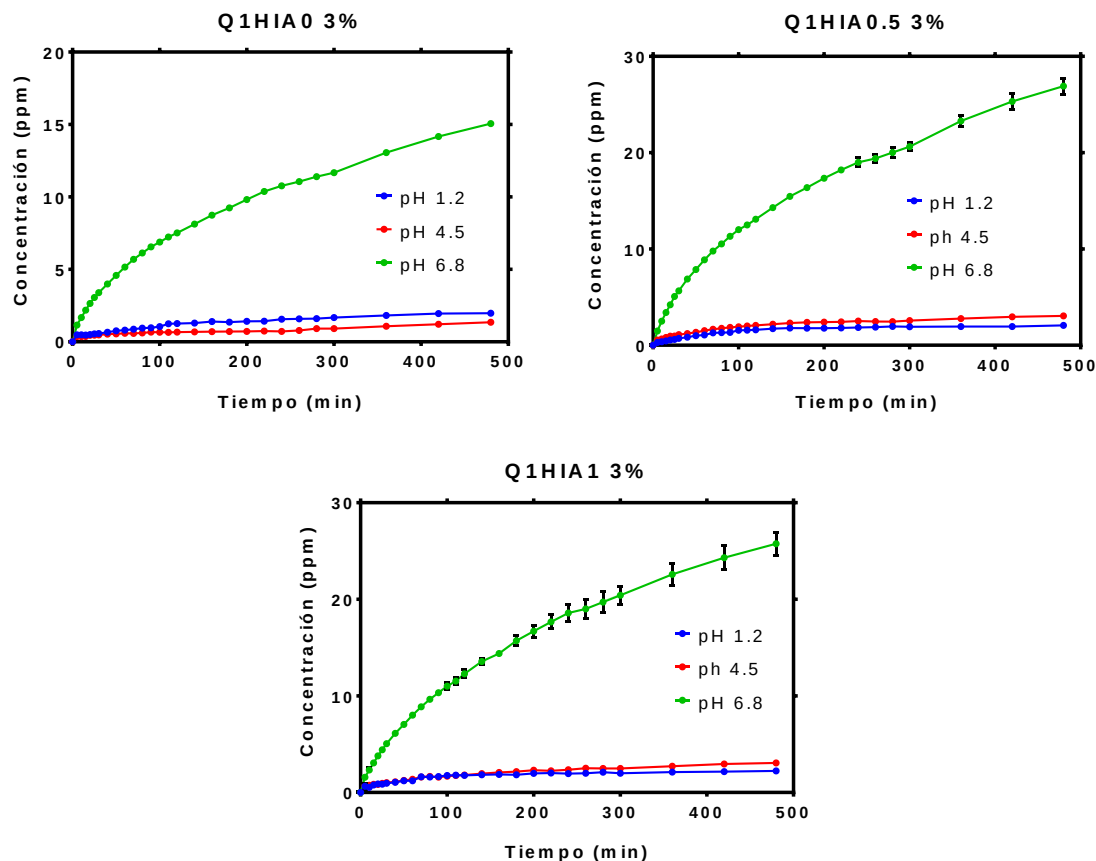


Figura 16: Concentración disuelta de diclofenaco (ppm) contra tiempo (min).

La figura anterior (fig. 15) muestra que para todos los materiales, a pH 6,8 se dio una mayor liberación del fármaco con respecto al tiempo en comparación con los demás valores de pH, esto puede ser explicado por los grupos carboxilo presentes en las redes poliméricas, que a pH más básico, se encontrarán en su estado ionizado (carboxilato), favoreciendo las interacciones con el agua, lo que genera relajación de la red, aumento de la entrada de medio a la matriz y por tanto mayor liberación del diclofenaco contenido.

Cabe resaltar que el material que tuvo la mayor liberación de diclofenaco sódico fue Q1HIA0.5 3% , con una concentración final de 32 ppm, le sigue el Q1HIA1 3% con 27 ppm y por último el material control Q1HIA0 3%.

Dos características importantes están vinculadas al diclofenaco. En primer lugar, su solubilidad, que depende del pH del medio de liberación; En soluciones ácidas la solubilidad es inferior a 1 mg/ml (69). Sin embargo, la solubilidad aumenta a un pH por encima de 6.5 (69-71). Este hecho explica el comportamiento observado en las cinéticas de liberación, donde a pesar de que a pH bajos el hinchamiento de las redes fuera mayor, la liberación del diclofenaco se vio limitada por su baja solubilidad debido a que se encuentra en su forma ácida y no en su forma de sal.

En segundo lugar, el diclofenaco sódico sufre una ciclación intramolecular en condiciones ácidas (Fig.16) que se encuentran en los jugos gástricos, lo que puede causar su inactivación y disminución de la liberación. Como consecuencia de la ciclación intramolecular, se pierde el sodio, por lo tanto, la solubilidad del compuesto disminuye aún más.

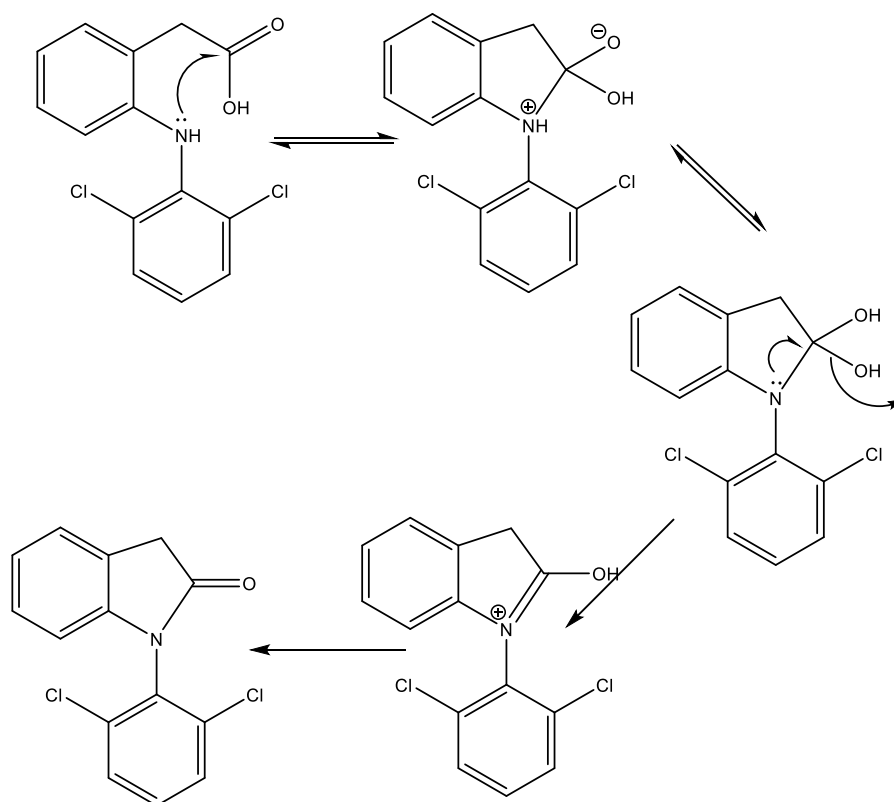


Figura 17: Reacción de ciclación del diclofenaco sódico a pH ácido (69).

La ciclación en condiciones ácidas es reversible cuando el pH de la solución circundante cambia a básico o neutro con una alta proporción de Sodio (69). Por lo tanto, no sería necesario protegerlo de la acción de los jugos gástricos.

Con el objetivo de explicar y profundizar sobre los perfiles de disolución determinados, a partir de los posibles mecanismos de liberación del fármaco modelo desde el sistema matricial, se realizó un análisis cinético mediante la utilización de varios modelos semi – empíricos. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Parámetros y coeficientes de determinación de los modelos cinéticos de liberación.

Materiales	pH	Orden cero		Orden 1		Korsmeyer-peppas			Higuchi	
		K	R ²	K	R ²	K _r	n	R ²	K	R ²
Q1HIA0 3%	1.2	0.0036	0.9002	0.009212	0.5768	0.068632	0.3959	0.9488	3.5715	0.9799
	4.5	0.0018	0.9308	0.005527	0.8835	0.056540	0.2679	0.9684	3.3782	0.8972
	6.8	0.0299	0.924	0.004700	0.6866	0.018823	0.5635	0.9959	3.0039	0.8722
Q1HIA0.5 3%	1.2	0.0038	0.7139	0.010133	0.5579	0.047931	0.4712	0.9477	1.293	0.9062
	4.5	0.0053	0.8099	0.006909	0.6672	0.056642	0.3968	0.9838	2.6734	0.9539
	6.8	0.0542	0.9275	0.005500	0.6411	0.015861	0.617	0.9913	2.6702	0.9815
Q1HIA1 3%	1.2	0.0036	0.6876	0.017733	0.7836	0.089046	0.35784	0.9413	2.6919	0.9982
	4.5	0.0053	0.8848	0.006909	0.7786	0.063934	0.3666	0.9793	3.1028	0.9979
	6.8	0.0535	0.9353	0.005200	0.6710	0.016938	0.6295	0.9967	3.6767	0.9971

Como se observa en la tabla 5, la liberación del diclofenaco a partir de los materiales sintetizados se ajusta a la ecuación semi-empírica proporcionada por Korsmeyer-Peppas con un coeficiente de determinación alto (por encima de un 95%).

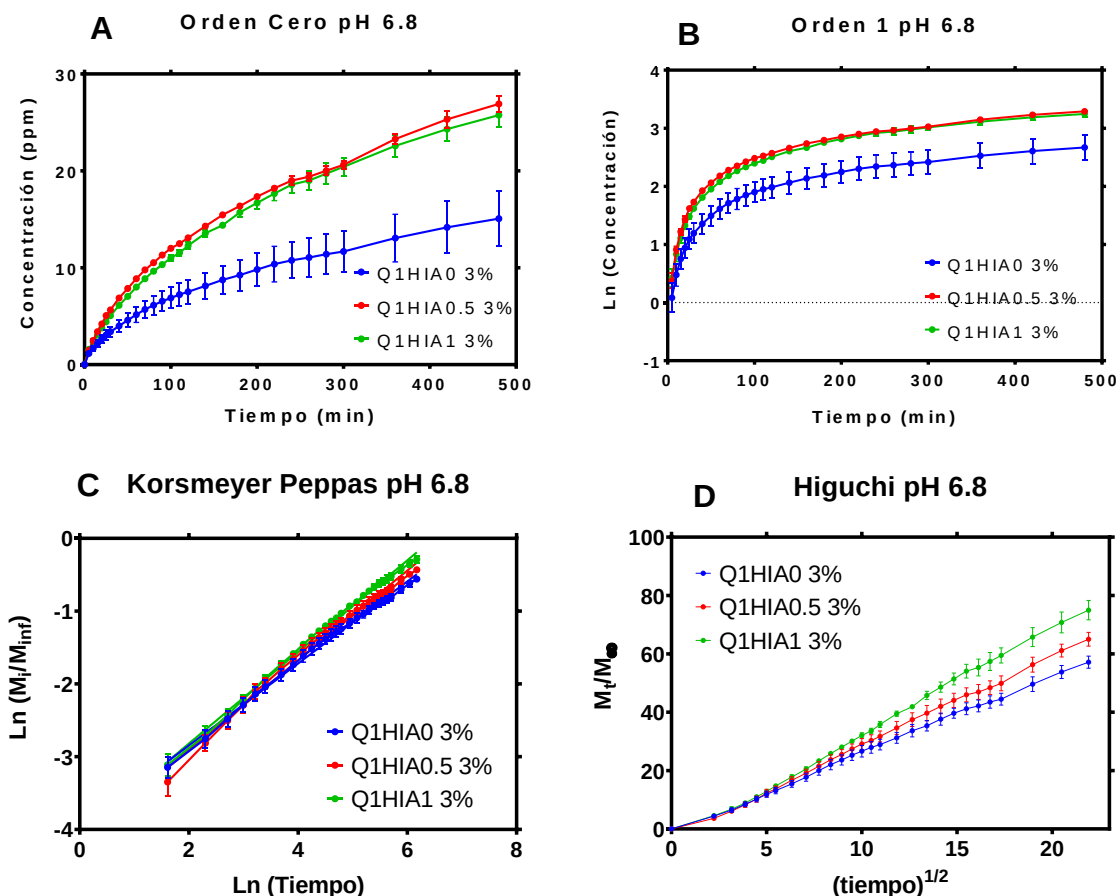


Figura 18: Graficas obtenidas de la transformación de los datos a los distintos modelos cinéticos: A. Orden Cero, B. Orden 1, C. Korsmeyer-Peppas, D. Higuchi.

Los valores de K_r obtenidos muestran una tendencia a disminuir con el aumento del pH implicando una liberación más lenta. Esto se podría explicar por el grado de hinchamiento del material a estos pHs, ya que a pesar de que el fármaco es poco soluble en pH ácidos (1.2 y 4.5), el grado de hinchamiento es mayor, captando una mayor cantidad de agua y, por lo tanto, produciendo una liberación más rápida del fármaco.

Para los pH ácidos el valor de n fue menor a 0.45 en todos los materiales estudiados, indicando una liberación regida por la ley de difusión de Fick. En comparación, a pH básico el valor de n fue mayor a 0.45 mostrando que la liberación tuvo un comportamiento de transporte anómalo (60, 72-74).

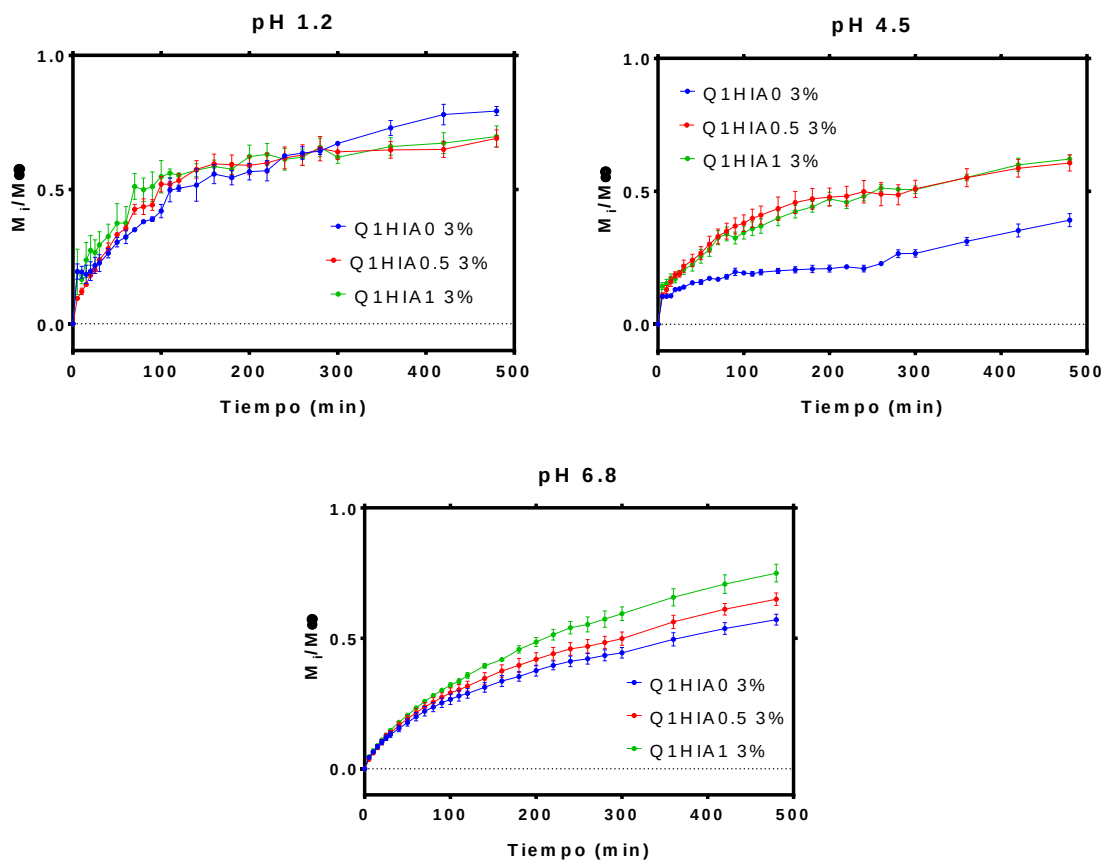


Figura 19: Cinética de liberación de diclofenaco sódico de los materiales Q1HIA0 3%, Q1HIA0.5 3% y Q1HIA1 3% a diferentes pH y 37°C.

La ley de Fick describe bien la etapa inicial de la liberación, luego se produce un ligero sobrehinchamiento debido a la relajación relativamente lenta de las cadenas de polímero, en comparación con la velocidad de deformación debida al hinchamiento (75).

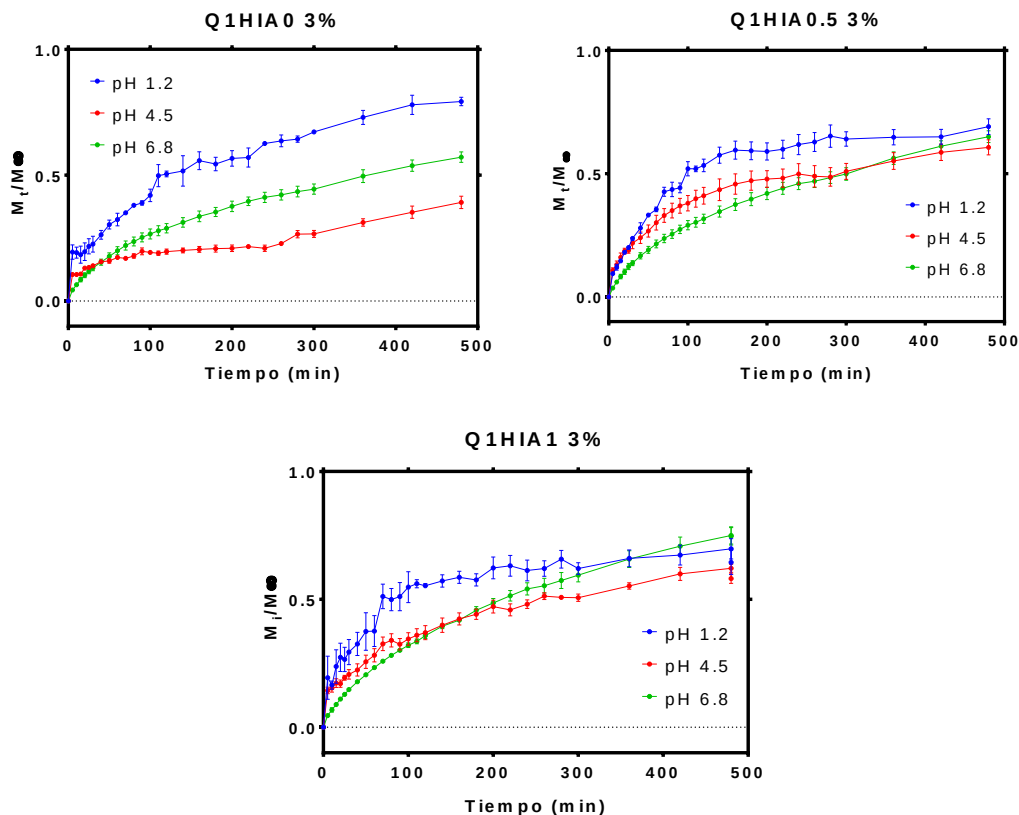


Figura 20: Cinética de liberación de diclofenaco sodico a pH 1.2, 4.5 y 6.8 paea cada material.

A pH básico un comportamiento de transporte anómalo indica dos fenómenos diferentes, el hinchamiento y la difusión (38, 60). Aunque el transporte por difusión contribuye más a la velocidad de liberación de un fármaco, el proceso de relajación es relevante sólo cuando el pH del medio de liberación se incrementa (60).

Como se observa en la tabla 5, los resultados obtenidos se ajustan muy bien al modelo de Higuchi, indicando que la liberación del fármaco fue por difusión. Es de resaltar que los materiales interpenetrados fueron los que se ajustaron de mejor manera a este modelo sugiriendo que la incorporación de una segunda red polimérica al material afecta significativamente en la difusión del fármaco (figura 18).

La figura 19 muestra la relación final de la liberación M/M_{inf} en comparación con el pH del medio para todos los materiales estudiados, mostrando una influencia significativa en el

comportamiento de la liberación para el material Q1HIA0 3%, donde la liberación baja y vuelve a subir a medida que el pH aumenta. En los materiales interpenetrados Q1HIA0.5 3% y Q1HIA1 3% el pH no presenta una influencia significativa en el comportamiento de liberación. Cabe resaltar que a pesar de que no fuera significativo el efecto, se observó una tendencia a “controlar” mejor la liberación a medida que el pH aumentaba; esto puede ser debido a que a pH altos el hidrogel se hincha menos, limitando la liberación del fármaco de la matriz.

Se realizó un diseño factorial donde se comparaban la composición y el pH como factores principales que afectan las variables de respuesta, que para el caso de la liberación fueron la constante cinética de liberación y la concentración final liberada por cada material.

Analizando los resultados obtenidos del diseño se observó que el pH es el factor que tiene principal efecto sobre la constante de liberación del fármaco (valor $p = 0.000$). En comparación, la composición no presenta influencia en la liberación del fármaco (Valor $p = 0.368$). lo anterior es confirmado en el diagrama de Pareto obtenida de la regresión factorial general. Figura 21.

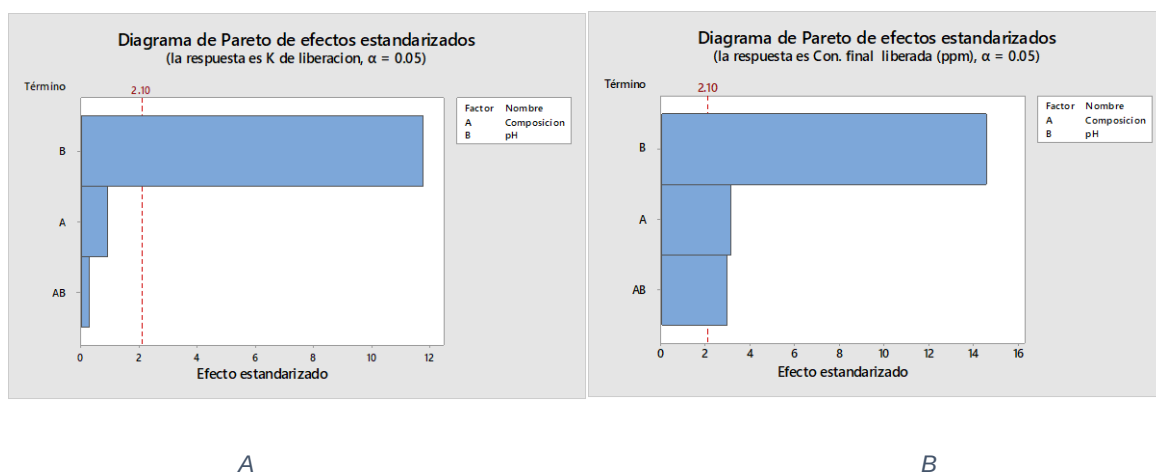


Figura 21: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados sobre la constante de liberación (A) y la concentración final liberada (B).

Con respecto a la concentración final liberada (figura 21 B) se determinó que tanto la composición, el pH y la interacción entre los dos factores tienen efecto sobre este, cabe resaltar que al analizar el diagrama de Pareto muestra que el factor que más tiene influencia sobre la liberación es el pH.

Por último, la interacción entre factores (figura 22) muestra una tendencia de comportamiento de los materiales, donde no hay cambios significativos de las medias cuando se cambia la composición, en cambio, cuando se cambia el pH de la solución de liberación, la constante de liberación se ve mayormente afectada. Cabe resaltar que la composición de los materiales si impactó en la concentración final liberada, donde la composición Q1HIA0.5 3% presento la mayor concentración de fármaco liberado.

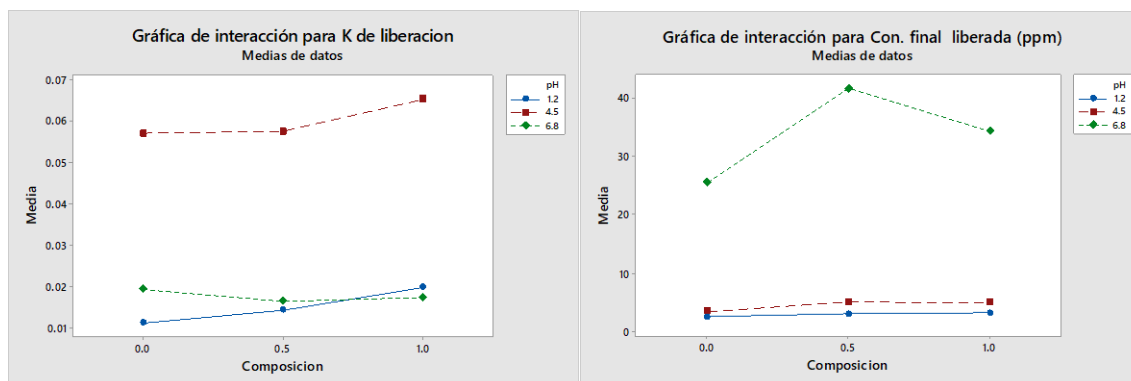


Figura 22: Grafica de interacciones entre factores para la constante de liberación y la concentración final liberada.

Con el objetivo de determinar la composición que responde mejor la liberación se realizó una optimización entre el hinchamiento máximo de los materiales, la concentración final liberada y las constantes de liberación e hinchamiento. La gráfica de optimización muestra cómo las diferentes configuraciones experimentales afectan las respuestas para el modelo factorial estudiado.

Se desea maximizar el W_{inf} y la K de hinchamiento ya que estas respuestas están relacionadas con la captación de fármaco en la carga del hidrogel, mientras que se desea minimizar la k de liberación para así garantizar una liberación modificada.

El análisis arrojó que la mejor composición es la que contenga 1:0.55 en proporción entre quitosano y el copolímero respectivamente, además, el pH óptimo para realizar un estudio de liberación para el diclofenaco es por encima de 6.46. Lo anterior demuestra que la incorporación de p(HEMA-co-IA) si genera una mejora en la carga y liberación del fármaco modelo estudiado. También cabe resaltar que el aumento en proporción del copolímero en los IPN no mostro una influencia significativa en la liberación.

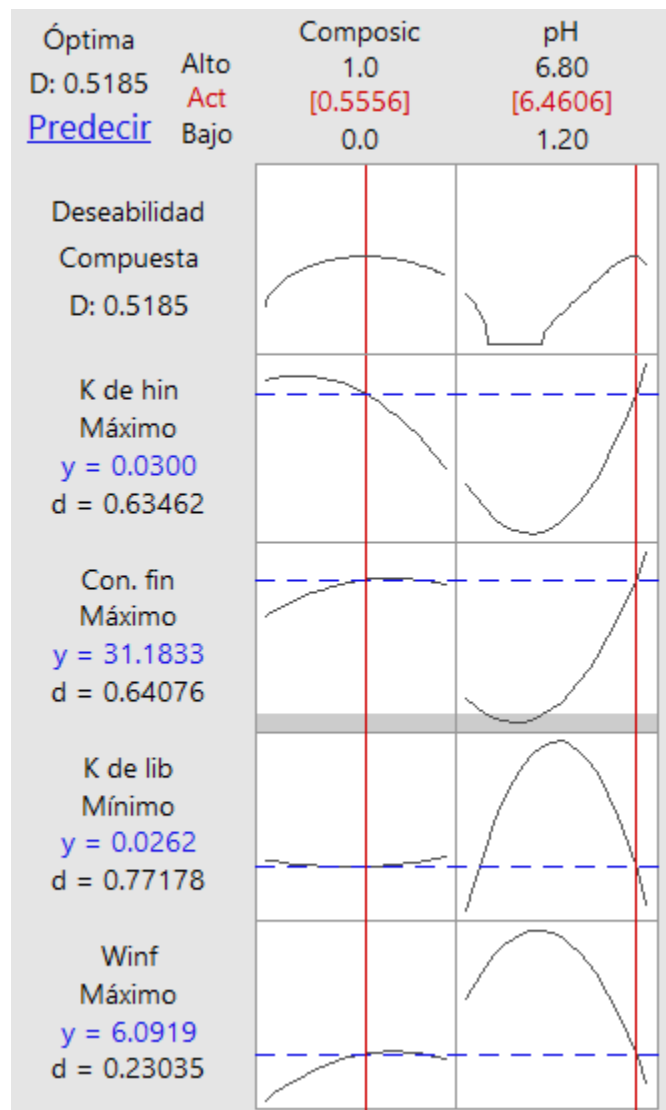


Figura 23: Gráfica de optimización de respuestas para la cinética de liberación

Pensando en un dispositivo de liberación controlada, sería conveniente que la matriz de liberación fuera más rígida para así retardar la liberación del fármaco. Los materiales estudiados tienen la capacidad de cambiar la rigidez de acuerdo con el pH donde se encuentren debido al hinchamiento. Al presentar un menor hinchamiento, las redes están menos relajadas impidiendo que el fármaco se libere de la matriz de forma efectiva.

7. CONCLUSIONES.

La síntesis de una red polimérica interpenetrada de quitosano y p(HEMA-co-IA) se llevó a cabo de forma satisfactoria. De esta forma se logró sintetizar las distintas composiciones de los 4 materiales interpenetrados propuestos.

La espectroscopia infrarroja (FT-IR) mostró una acentuada banda característica del carbonilo del éster y de la amida secundaria a medida que el entrecruzamiento del quitosano aumenta. De la misma manera, la intensidad de la banda correspondiente a la cadena alifática y la señal de carbonilo, provenientes del copolímero, aumenta con la concentración de p(HEMA-co-IA) en los materiales, concluyendo que los materiales si se formaron con las condiciones de reacción utilizadas y no hubo interferencias al momento de la síntesis.

Los estudios cinéticos de hinchamiento de los materiales sintetizados a diferentes pH se ajustaron a una cinética de segundo orden, donde el grado de hinchamiento máximo en el equilibrio (W_{∞}) aumentó con la incorporación de p(HEMA-co-IA).

La presencia de p(HEMA-co-IA) en las redes poliméricas interpenetradas genera un aumento en el hinchamiento, causando que mayor cantidad de solución de lisozima ingrese a la matriz y por tanto degrade mayor cantidad de polímeros, en contraste, no se observó diferencia significativa en la degradación entre las concentraciones de lisozimas utilizadas, ni tampoco por parte del nivel de entrecruzamiento. El factor tiempo tiene una influencia significativa en la degradación en los primeros 3 días de estudio.

Los materiales estudiados presentaron un comportamiento viscoelástico, predominantemente viscoso, donde la incorporación de copolímero afectó la deformación fina de los materiales interpenetrados siendo menor que la de los controles. Esto muestra una mayor rigidez del material lo cual favorece una liberación más lenta.

Se evaluó la cinética de liberación de diclofenaco a partir de los materiales interpenetrados Q1HIA0.5 3% y Q1HIA1 3% la cual se ajustó al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas, esto indica una liberación regida por el hinchamiento del material, por la ley de difusión de Fick

a pH ácidos, mientras que un comportamiento de transporte anómalo se observó a pH básico. A su vez, se evidenció que los materiales interpenetrados Q1HIA 0.5 y Q1HIA 1 funcionan como vehículo de liberación prolongada.

Existe influencia del pH en la magnitud de liberación del fármaco como en el hinchamiento del material, siendo los valores de pH altos los que favorecen la liberación del diclofenaco, pero disminuye la capacidad de hinchamiento y por tanto la liberación se hace mas controlada.

La optimización de respuestas muestra que el mejor material para realizar la liberación del fármaco es el Q1HIA0.5 3% ya que presento el mejor hinchamiento y la mejor liberación en el tiempo estudiado.

8. RECOMENDACIONES.

Sería interesante estudiar el hinchamiento del material sometido a distintos pHs en intervalos de tiempo diferentes. Con esto se podría estudiar como el material responde a cambios repentinos en las condiciones de hinchamiento. Esto se realizaría pensando en la aplicación de los materiales sintetizados como dispositivos de administración de fármacos por vía oral, donde las condiciones de pH cambian a medida que pasa a través del organismo.

Por último, realizar análisis reológicos más exhaustivos a estos materiales (compresión, oscilatorias y con rampas de temperaturas) que ayuden a determinar en mayor medida que material expresa las mejores propiedades mecánicas.

Con respecto a la liberación controlada de fármacos, se podría plantear la carga del fármaco directamente durante la síntesis del material para así garantizar la concentración deseada del fármaco en el material. Cabe resaltar que esto depende de la solubilidad de dicho componente, el fármaco tiene que ser polar para que la carga sea efectiva por su solubilidad en agua. Por último, se propone estudios de biocompatibilidad en animales modelo para evaluar la citotoxicidad de los materiales.

9. REFERENCIAS.

1. Mabilieu GaSiCaH. Effects of the length of crosslink chain on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) swelling and biomechanical properties. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2006;77(1):35--42.
2. Donatelli AAaSLHaTDA. Interpenetrating Polymer Networks Based on SBR PS . 1 . Control of Morphology by Level of Cross-Linking. 1976;9(4).
3. Sperling LH. The Current Status of Interpenetrating. 1996;7(March 1995):197--208.
4. García J, Ruiz-Durántez E, Valderruten N. Interpenetrating polymer networks hydrogels of chitosan and poly (2-hydroxyethyl methacrylate) for controlled release of quetiapine. *Reactive and Functional Polymers*. 2017;117:52-9.
5. Casimiro MHaGMHaLJP. Drug release assays from new chitosan/pHEMA membranes obtained by gamma irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 2007;265(1):406--9.
6. Sadeghi M. Synthesis and Swelling Behaviors of graft copolymer Based on Chitosan-g-poly(AA-co-HEMA). 2010;1(4):354--8.
7. Honarkar HaBM. Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2009;140(12):1403--20.
8. Ali A, Ahmed S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International journal of biological macromolecules*. 2018;109:273-86.
9. HPS AK, Saurabh CK, Adnan A, Fazita MN, Syakir M, Davoudpour Y, et al. A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications. *Carbohydrate polymers*. 2016;150:216-26.
10. Hamed I, Özogul F, Regenstien JM. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;48:40-50.
11. Hamedi H, Moradi S, Hudson SM, Tonelli AE. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate polymers*. 2018.
12. Gomes J, Belinha J, Jorge RN, editors. Application of chitosan in dentistry—a review. *Biodental Engineering V: Proceedings of the 5th International Conference on Biodental Engineering (BIODENTAL 2018)*, June 22-23, 2018, Porto, Portugal; 2019: CRC Press.
13. Li H, Hu C, Yu H, Chen C. Chitosan composite scaffolds for articular cartilage defect repair: a review. *RSC Advances*. 2018;8(7):3736-49.
14. Jiao J, Huang J, Zhang Z. Hydrogels based on chitosan in tissue regeneration: How do they work? A mini review. *Journal of Applied Polymer Science*. 2019;136(13):47235.
15. Mohebbi S, Nezhad MN, Zarrintaj P, Jafari SH, Gholizadeh SS, Saeb MR, et al. Chitosan in biomedical engineering: a critical review. *Current stem cell research & therapy*. 2019;14(2):93-116.
16. Saini RaBJaBAK. Nanoparticles in Biology and Medicine. 2012;906:321--8.
17. Jones DSaLCPaMCPaGSP. Characterization of the physicochemical, antimicrobial, and drug release properties of thermoresponsive hydrogel copolymers designed for medical device applications. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2008;85(2):417--26.
18. Hamidi MaAAaRP. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(15):1638--49.

19. Rezaei SM. Grafting of collagen onto interpenetrating polymer networks of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(dimethyl siloxane) polymer films for biomedical applications. *Express Polymer Letters*. 2013;8(1):39--49.
20. Ziegelaar BWaFJHaCaBaPSTaMMaaCTV. The modulation of corneal keratocyte and epithelial cell responses to poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogel surfaces: phosphorylation decreases collagenase production in vitro. *Biomaterials*. 1999;20(21):1979-88.
21. Krezović BD, Miljković MG, Stojanović ST, Najman SJ, Filipović JM, Tomić SL. Structural, thermal, mechanical, swelling, drug release, antibacterial and cytotoxic properties of P (HEA/IA)/PVP semi-IPN hydrogels. *Chemical Engineering Research and Design*. 2017;121:368-80.
22. Hou W, Shen Y, Liu H, Zhang A, Dai S. Mechanical properties of pH-responsive poly (2-hydroxyethyl methacrylate/methacrylic acid) microgels prepared by inverse microemulsion polymerization. *Reactive and Functional Polymers*. 2014;74:101-6.
23. Omidian H, Park K, Kandam U, Rocca JG. Swelling and mechanical properties of modified HEMA-based superporous hydrogels. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2010;25(5):483-97.
24. Tomić SL, Mićić MM, Dobić SN, Filipović JM, Suljovrujić EH. Smart poly (2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid) hydrogels for biomedical application. *Radiation Physics and Chemistry*. 2010;79(5):643-9.
25. Lekow UaEZHŽ. Drug Release from Hydrogel Matrices. 2010;17(2).
26. Lee JH, Yeo Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical engineering science*. 2015;125:75-84.
27. Katime IA. *Materiales Inteligentes: Hidrogeles macromoleculares. Algunas aplicaciones biomedicas*. 2004.
28. Luppi B, Bigucci F, Cerchiara T, Zecchi V. Chitosan-based hydrogels for nasal drug delivery: from inserts to nanoparticles. *Expert opinion on drug delivery*. 2010;7(7):811-28.
29. Şenel S, İkinci G, Kaş S, Yousefi-Rad A, Sargon M, Hıncal A. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2000;193(2):197-203.
30. Xinming L, Yingde C, Lloyd AW, Mikhalovsky SV, Sandeman SR, Howel CA, et al. Polymeric hydrogels for novel contact lens-based ophthalmic drug delivery systems: A review. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2008;31(2):57-64.
31. Donnelly RF, Singh TRR, Garland MJ, Migalska K, Majithiya R, McCrudden CM, et al. Hydrogel-forming microneedle arrays for enhanced transdermal drug delivery. *Advanced functional materials*. 2012;22(23):4879-90.
32. Sperling LH. *Introduction to physical polymer science*: Wiley Online Library; 2006.
33. Shastri VP. Non-degradable biocompatible polymers in medicine: past, present and future. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2003;4(5):331--7.
34. Peppas N, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2000;50(1):27-46.
35. Hennink WEavNCF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64:223--36.
36. Hoffman aS. Hydrogels for biomedical applications. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;944:62--73.

37. Almeida JFaFPaLaaGMH. Photocrosslinkable biodegradable responsive hydrogels as drug delivery systems. *International journal of biological macromolecules*. 2011;49(5):948--54.
38. Bierbrauer F. Hydrogel Drug Delivery : Diffusion Models.1--31.
39. Brazel CSaPNa. Dimensionless analysis of swelling of hydrophilic glassy polymers with subsequent drug release from relaxing structures. *Biomaterials*. 1999;20(8):721--32.
40. Arredondo A. Hidrogeles. *Potenciales biomateriales para la liberaci' o n controlada de medicamentos*. 2009.
41. Nanomaterials S-a. Hydrogels : From Soft Contact Lenses and Implants to. 2009;47:5929--46.
42. Kikuchi AaOT. Pulsatile drug release control using hydrogels. *Advanced drug delivery reviews*. 2002;54(1):53--77.
43. Montheard J-P. 2-Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA): Chemical Properties and Applications in Biomedical Fields. 1992(1):1-34.
44. Montheard J-paCMaCD. *Journal of Macromolecular Science , Part C 2-Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA) : Chemical Properties and Applications in Biomedical*. (May 2013):37--41.
45. Il'ina aVaKSNaCGIaGNGaVVP. Obtaining and study of monosaccharide derivatives of low-molecular-weight chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008;44(5):551--8.
46. Blair HALSaGJaLT-kaABET. Chitosan and Modified Chitosan Membranes I . Preparation and Characterisation. 1987;33:641--56.
47. Lohani A, Singh G, Bhattacharya SS, Verma A. Interpenetrating polymer networks as innovative drug delivery systems. *Journal of drug delivery*. 2014;2014.
48. Sperling LH. *Interpenetrating Polymer Networks and Related Materials*. 1977;12(I):141--80.
49. Klemptner D. *Polymer alloys: blends, blocks, grafts, and interpenetrating networks*: Springer Science & Business Media; 2012.
50. Kim SJaSSRaSDIaKIYaKSI. Synthesis and characteristics of semi-interpenetrating polymer network hydrogels based on chitosan and poly(hydroxy ethyl methacrylate). *Journal of Applied Polymer Science*. 2005;96(1):86--92.
51. Dimida S, Demitri C, De Benedictis V, Scalera F, Gervaso F, Sannino A. Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015;132.
52. Klein MP, Hackenhaar CR, Lorenzoni ASG, Rodrigues RC, Costa TMH, Ninow JL, et al. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*. 2016;137:184-90.
53. Desbrie JaBJaLJaGFMaAW. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. 2001;42.
54. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *spectrometric identification of organic compounds*. New York: John Wiley and sons, inc.; 2005.
55. Farahani V. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. 2010;19(5):375--98.
56. Taşdelen B, Kayaman-Apohan N, Güven O, Baysal BM. Preparation of poly (N-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels and their drug release behavior. *International journal of pharmaceutics*. 2004;278(2):343-51.

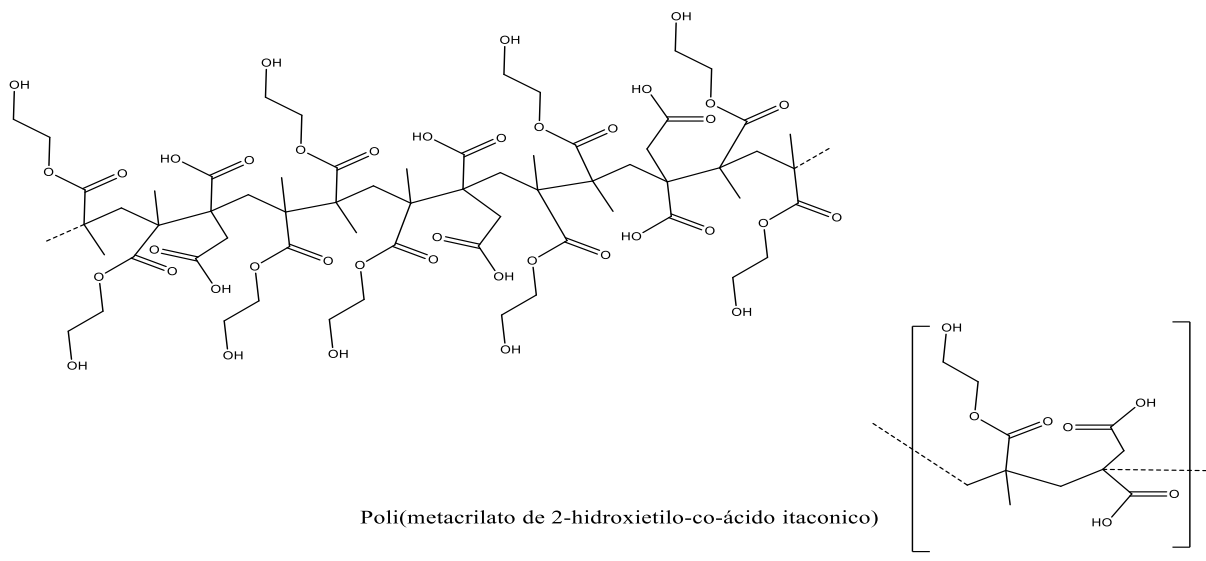
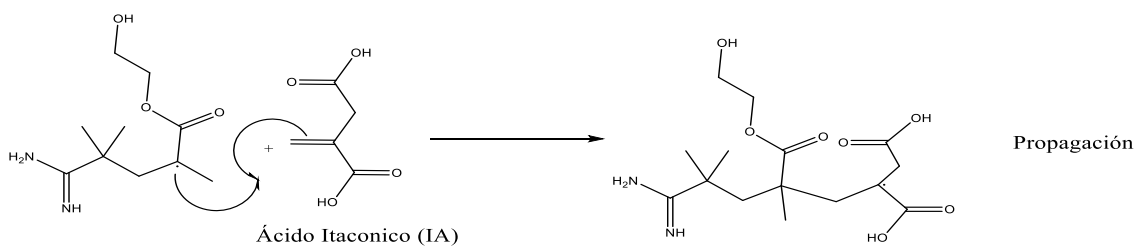
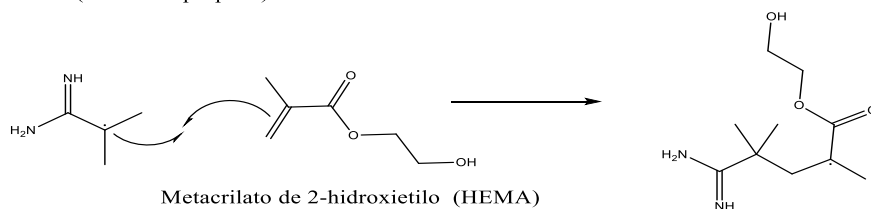
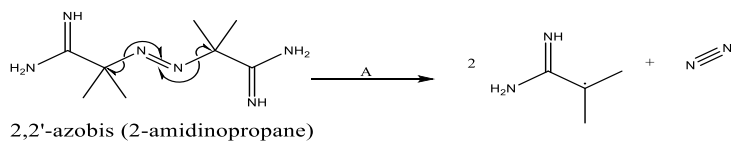
57. Database. P. Itaconic Acid: National Center for Biotechnology Information.; [updated (accessed on May 1, 2019). Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/811>.
58. Qiu YaPK. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2001;53(3):321--39.
59. Casanovas AaHMaDMaHMJ. Rheological Characterization of Chitosan Matrices : Influence of Biopolymer Concentration. 2007.
60. Valderruten NEaVJDaZFaR-DnE. Synthesis and characterization of chitosan hydrogels cross-linked with dicarboxylic acids. *Reactive and Functional Polymers*. 2014;84:21--8.
61. Cowie JMG, Arrighi V. *Polymers: chemistry and physics of modern materials*: CRC press; 2007.
62. O. Diez-Sales MD, M. J. Hernandez, A. Casanovas, M. Herraéz1. Rheological Characterization of Chitosan Matrices: Influence of Biopolymer Concentration. *Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)*. 2007:2121-8.
63. Valderruten NE, Valverde, J.D., Zuluaga, F., E. Ruiz-Durántez. Synthesis and characterization of chitosan hydrogels cross-linked with. *Reactive & Functional Polymers* 84. 2014:21--8.
64. Macosko CW. *Rheology. Principles, Measurements and Applications*. New York: Wiley-VCH; 1994.
65. Gartner C, & López, Betty Lucy. Medidas de la rigidez del quitosano en solución a través de la viscosidad intrínseca. . *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*. 2010;(53):20-9.
66. Lampman S. *Characterization and failure analysis of plastics*: Asm International; 2003.
67. Kumashiro YaLWKaOTaYN. Enzymatic Degradation of Semi-IPN Hydrogels Based on N- Isopropylacrylamide and Dextran at a Specific Temperature Range. 2002:407--10.
68. Ren DaYHaWWaMX. The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Research*. 2005;340(15):2403--10.
69. Palomo ME, Ballesteros MP, Frutos P. Analysis of diclofenac sodium and derivatives. *J Pharm Biomed Anal*. 1999;21(1):83-94.
70. Kincl M, Vrečer F, Veber M. Characterization of factors affecting the release of low-solubility drug from prolonged release tablets. *Analytica Chimica Acta*. 2004;502(1):107-13.
71. Emara L, Taha N, Mursi N. Investigation of the Effect of Different Flow-Through Cell Designs on the Release of Diclofenac Sodium SR Tablets. *Dissolution Technologies*. 2009;16.
72. Peppas NAaFNM. The swelling interface number as a criterion for prediction of diffusional solute release mechanisms in swellable polymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*. 1983;21(6):983--97.
73. Siepmann JaPNa. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;48(2-3):139--57.
74. Ruiz JaMnaaCdV. Investigation of loading and release in PVA-based hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*. 2002;85(8):1644--51.

75. Bat E. HYDROXYETHYL METHACRYLATE BASED NANOCOMPOSITE HYDROGELS WITH TUNABLE PORE ARCHITECTURE. Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry. 2016;3:607.

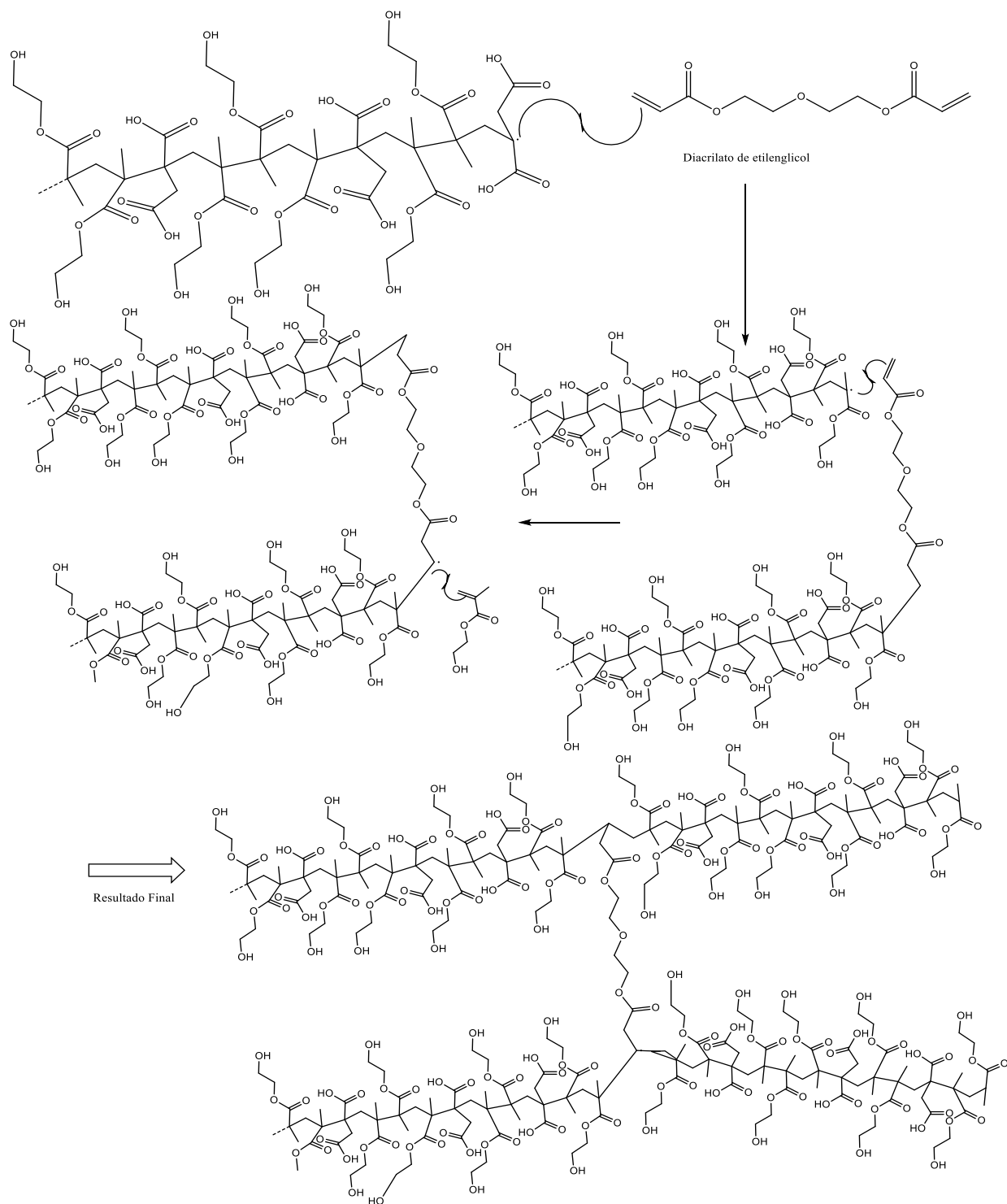
.

10. ANEXOS.

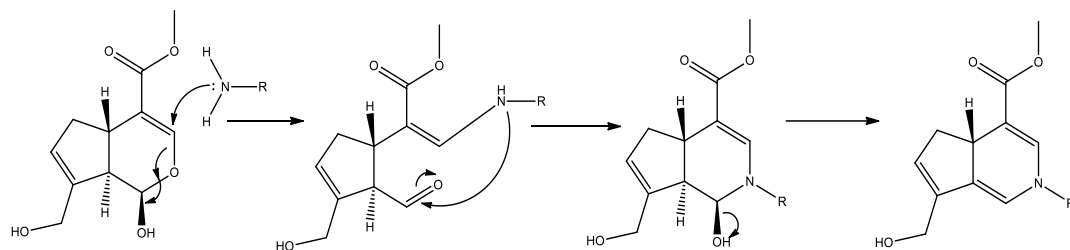
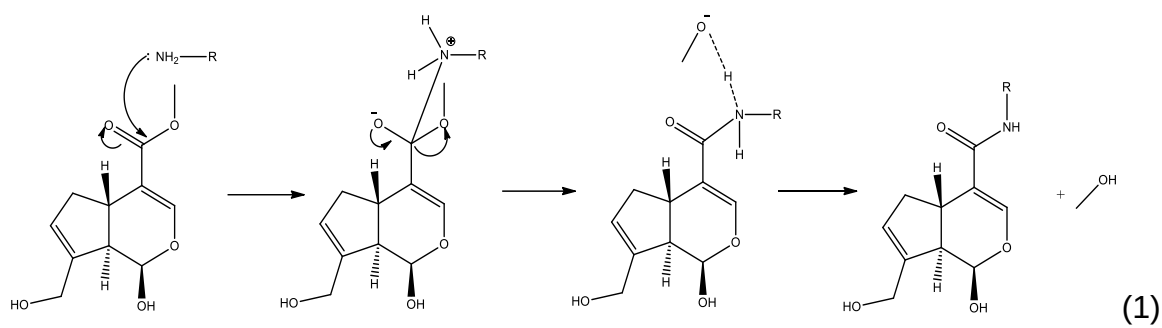
Iniciación



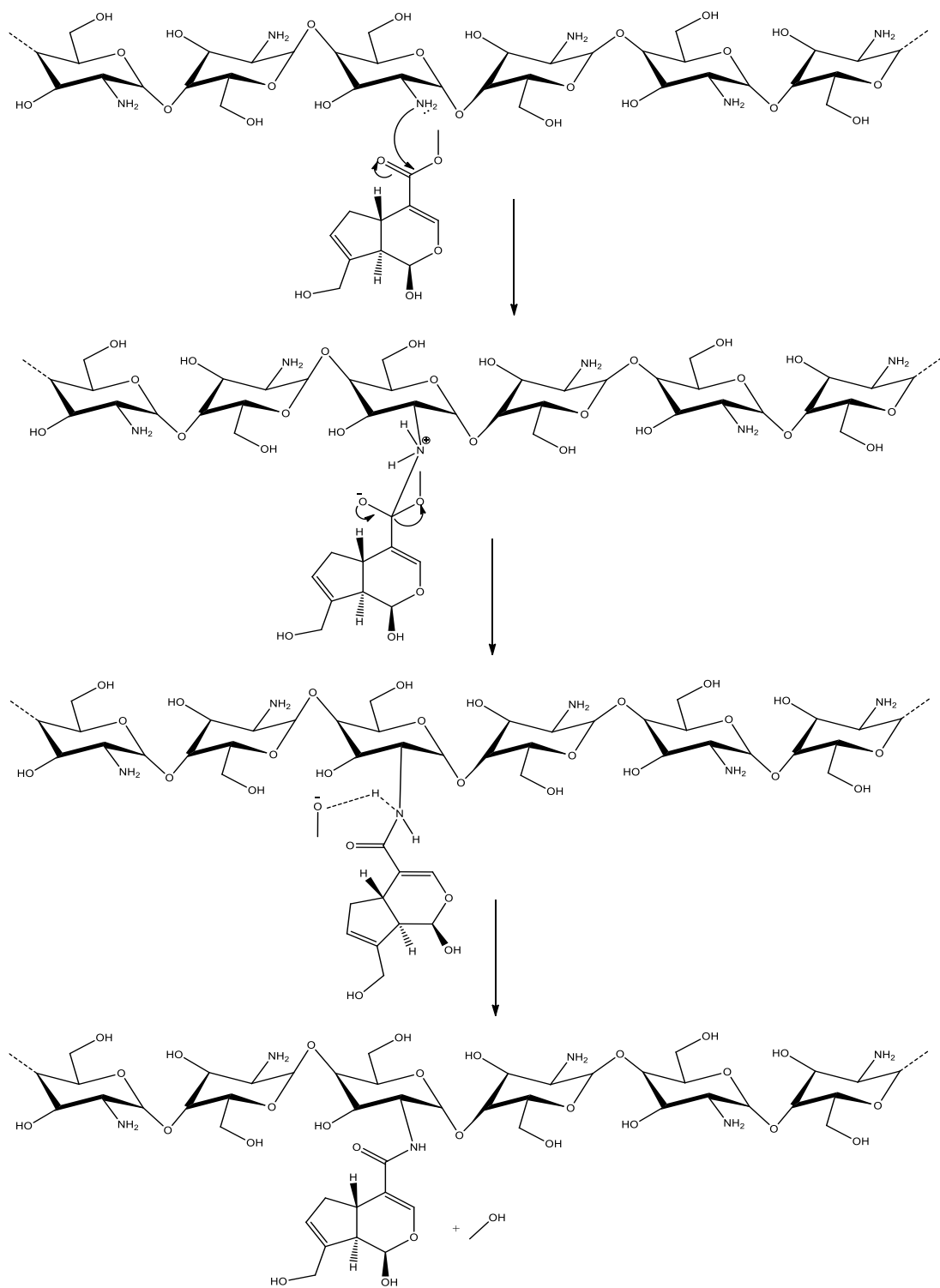
Anexo 1: Mecanismo de polimerización de HEMA por radicales libres.



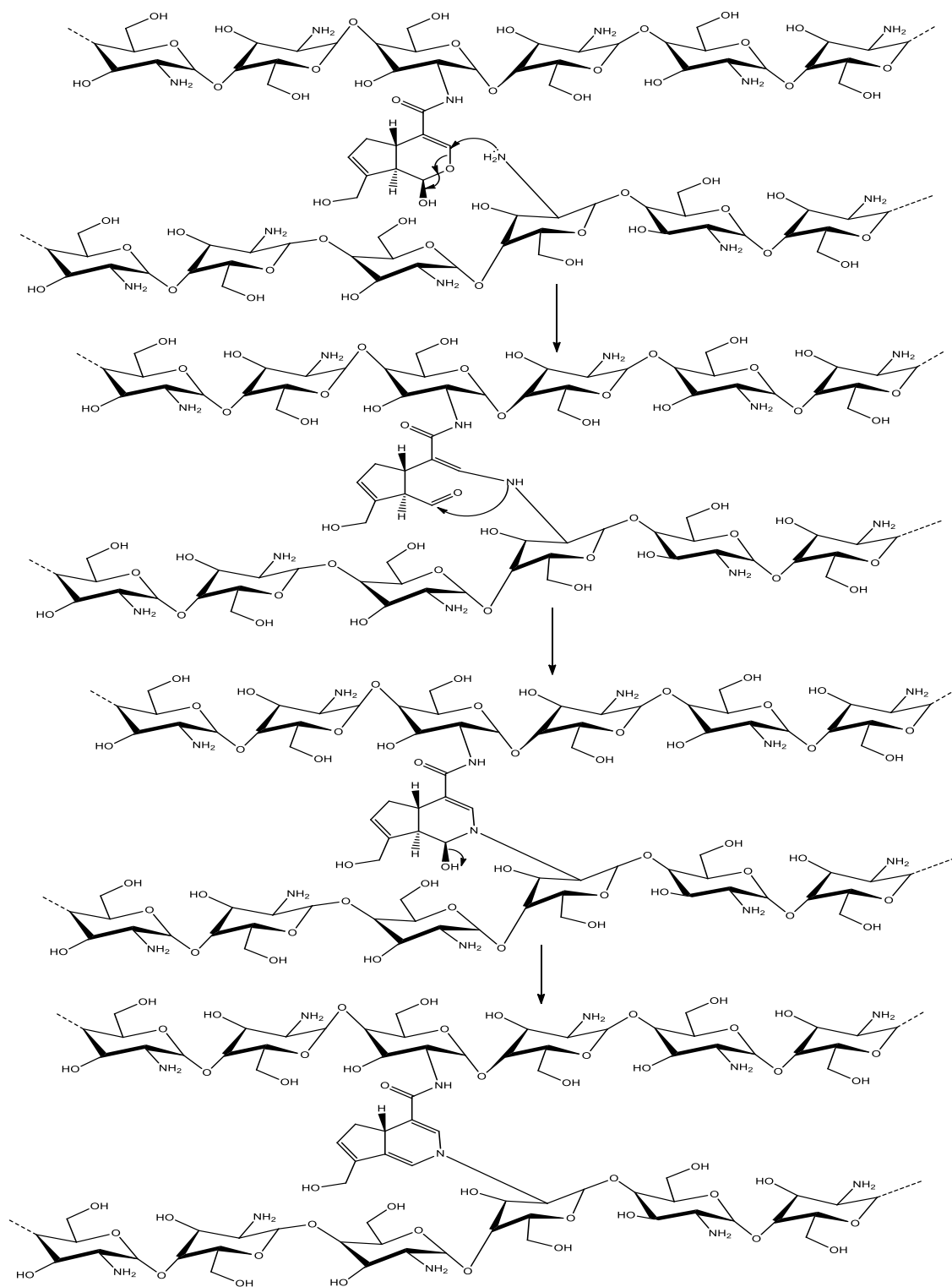
Anexo 2: Representación del entrecruzamiento entre la P(HEMA-co-IA) y el DEGDA



Anexo 3: Mecanismos de entrecruzamiento de la genipina. Se ilustra la formación de una amida (1) y la formación de un heterociclo (2)



Anexo 4: Mecanismo de entrecruzamiento de la genipina con la red de quitosano



Anexo 5 : Mecanismo de entrecruzamiento de la genipina con una segunda red de quitosano

Optimización de respuesta: K de hinchamiento, Con. ... iberacion, Winf

Parámetros

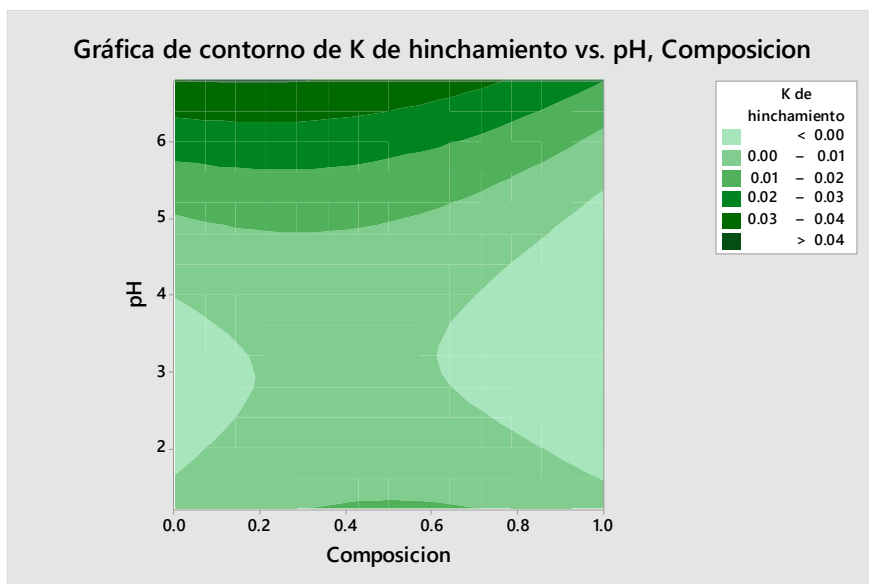
Respuesta	Meta	Inferior	Objetivo	Superior	Ponderación	Importancia
K de hinchamiento	Máximo	0.00038	0.0470		1	1
Con. final liberada (ppm)	Máximo	2.21053	47.4269		1	1
K de liberacion	Mínimo		0.0092	0.0838	1	1
Winf	Máximo	1.47664	21.5127		1	1

Solución

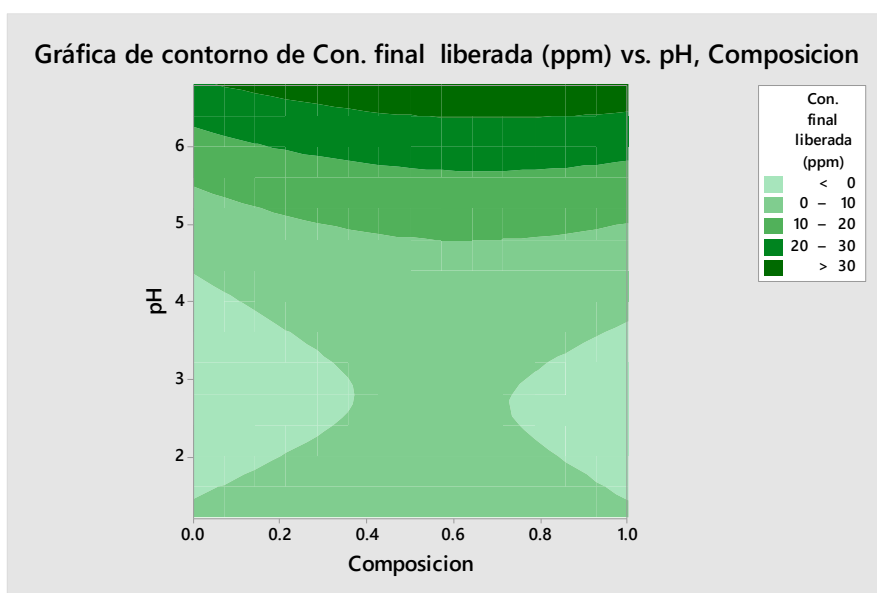
Solución	Composición	pH	K de hinchamiento Ajuste	Con. final liberada (ppm) Ajuste	K de liberacion Ajuste	Winf Ajuste	Deseabilidad compuesta
1	0.555556	6.46061	0.0299922	31.1833	0.0262297	6.09190	0.518526

Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	IP de 95%
K de hinchamiento	0.02999	0.00255	(0.02469, 0.03529)	(0.01534, 0.04465)
Con. final liberada (ppm)	31.18	1.69	(27.67, 34.69)	(21.47, 40.89)
K de liberacion	0.02623	0.00300	(0.01999, 0.03247)	(0.00897, 0.04349)
Winf	6.092	0.963	(4.089, 8.095)	(0.550, 11.634)

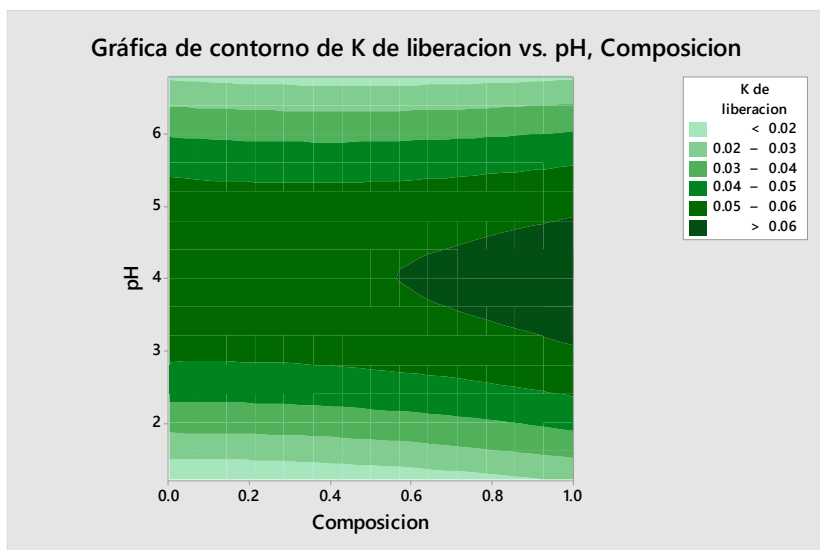
Anexo 6: Optimización de respuesta realizado para los materiales sintetizados



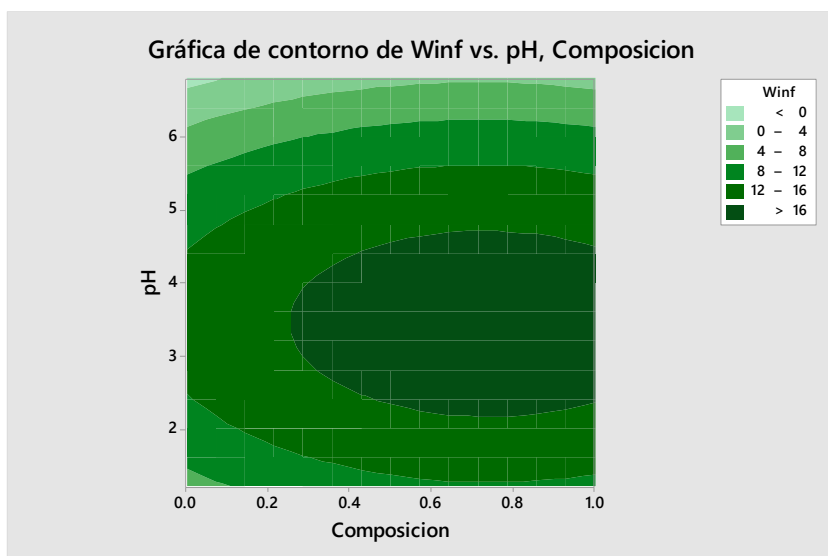
Anexo 7: Grafica de contornes de K de hinchamiento vs. pH y composición



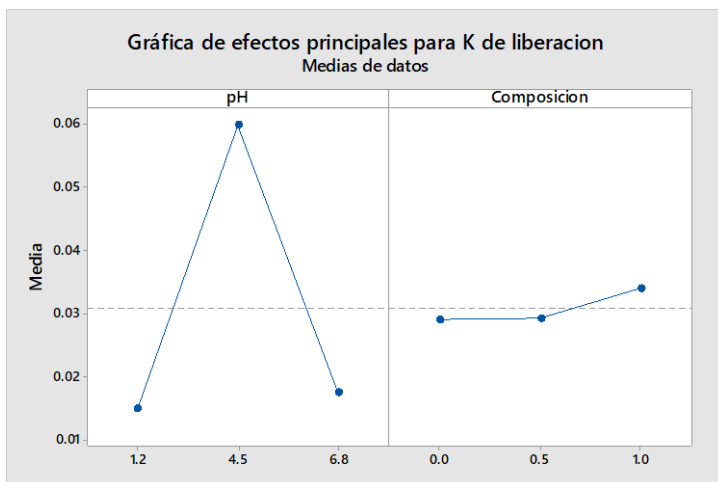
Anexo 8: Grafica de contornes de Concentración final liberada de diclofenaco sódico vs. pH y composición



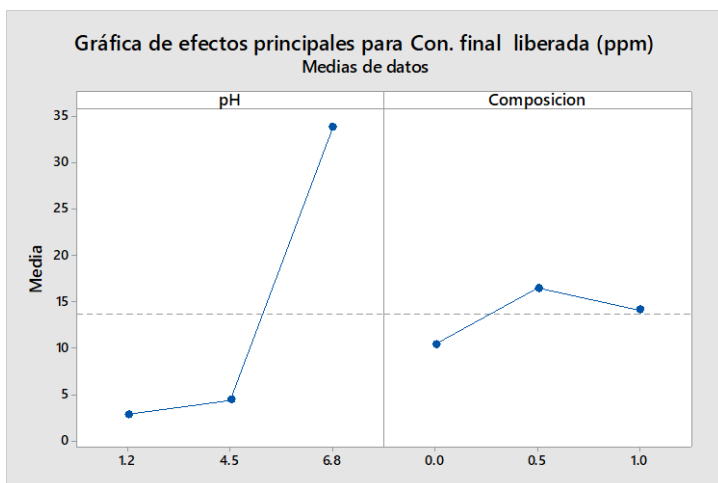
Anexo 9: Gráfica de contornes de K de liberación vs. pH y composición.



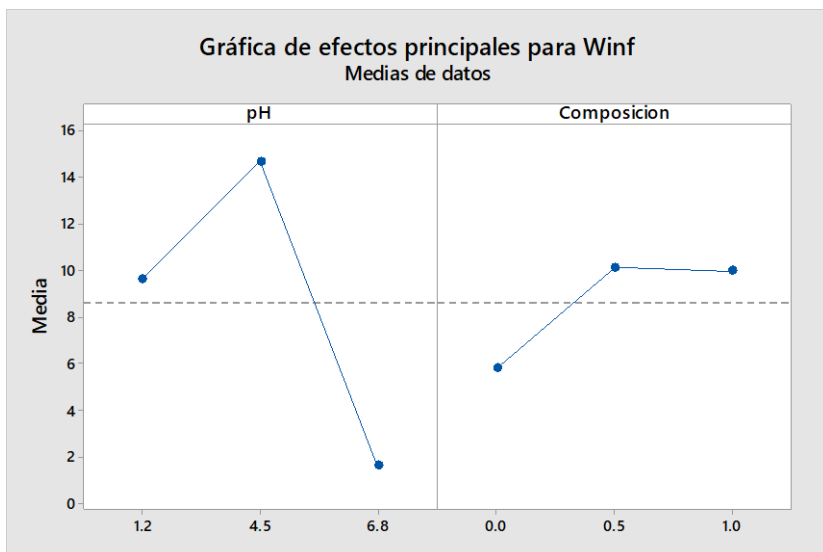
Anexo 10: Gráfica de contornes de K de hinchamiento vs. pH y composición.



Anexo 11: Grafica de efectos principales sobre la constante de liberación.



Anexo 12: Grafica de efectos principales sobre la concentracion final liberada del diclofenaco sodico



Anexo 13: Grafica de efectos principales para la relacion de hinchamiento en el infinito

Regresión factorial general: Proporción degradada vs. ... ecruzamiento

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tiempo	6	3, 6, 9, 12, 15, 21
Composicion	3	0.0, 0.5, 1.0
Concentracion Lisozima	2	0.01, 0.10
Entrecruzamiento	2	3%, 5%

Análisis de Varianza

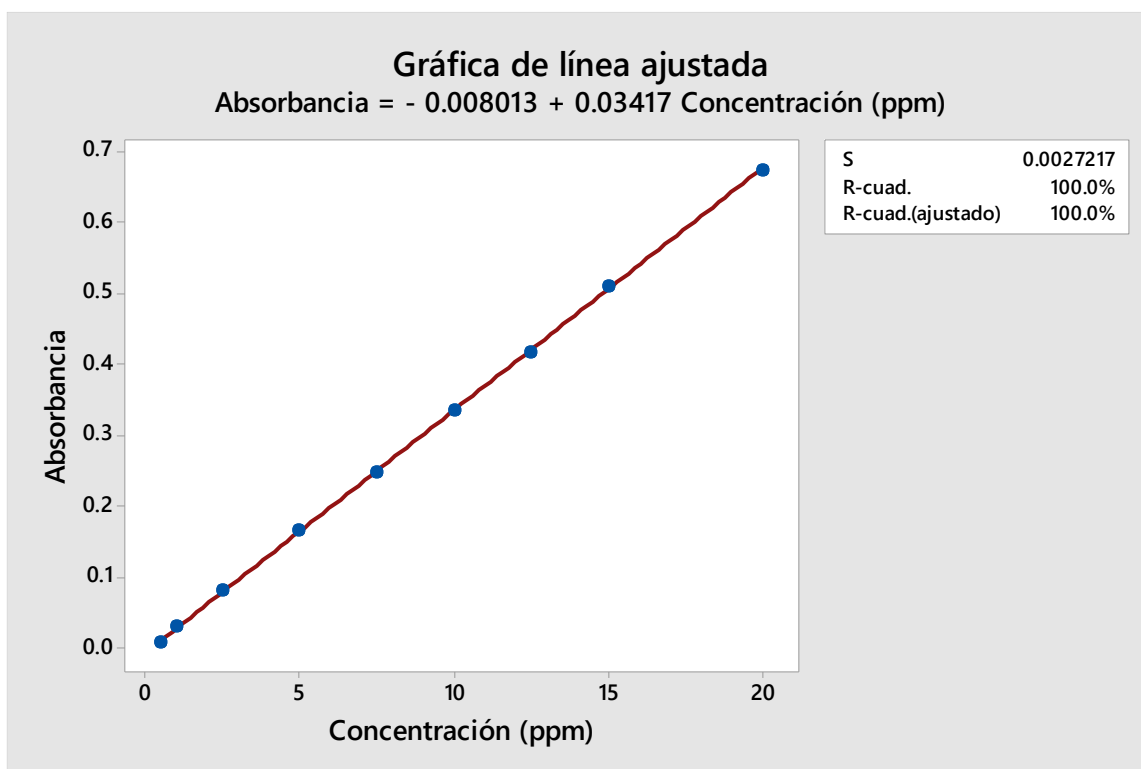
Fuente	Valor F	Valor p
Modelo	29.39	0.000
Lineal	217.64	0.000
Tiempo	98.27	0.000
Composicion	732.55	0.000
Concentracion Lisozima	1.87	0.174
Entrecruzamiento	0.42	0.516
Interacciones de 2 términos	4.57	0.000
Tiempo*Composicion	0.26	0.989
Tiempo*Concentracion Lisozima	0.56	0.731

Tiempo*Entrecruzamiento	0.81	0.546
Composicion*Concentracion Lisozima	9.54	0.000
Composicion*Entrecruzamiento	37.64	0.000
Concentracion Lisozima*Entrecruzamiento	10.55	0.001
Interacciones de 3 términos	0.44	0.993
Tiempo*Composicion*Concentracion Lisozima	0.63	0.790
Tiempo*Composicion*Entrecruzamiento	0.26	0.989
Tiempo*Concentracion Lisozima*Entrecruzamiento	0.29	0.915
Composicion*Concentracion Lisozima*Entrecruzamiento	0.81	0.448
Interacciones de 4 términos	0.20	0.996
Tiempo*Composicion*Concentracion Lisozima*Entrecruzamiento	0.20	0.996
Error		
Total		

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2.35925	93.55%	90.36%	85.48%

Anexo 14: Regresión factorial general realizada para la degradacion de los materiales.



Análisis de regresión: Absorbancia vs. Concentración (ppm)

La ecuación de regresión es

Absorbancia = - 0.008013 + 0.03417 Concentración (ppm)

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)
0.0027217	99.99%	99.99%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	0.422126	0.422126	56983.47	0.000
Error	7	0.000052	0.000007		
Total	8	0.422178			

Anexo 15: Curva de calibración realizada para la cuantificación de diclofenaco.

FÉ DE ERRATAS

La Universidad Icesi aclara que este proyecto de grado se ejecutó bajo el Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados N° 108 del 07 de mayo de 2018 y del Otrosí No. 1 del 17 de agosto del mismo año, en el marco del control que adelanta el Grupo de Recursos Genéticos de la Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Así como de la Resolución 0526 del 20 de mayo de 2016 de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA). Las muestras vegetales fueron recolectadas en la ciudad de Cali, Valle del Cauca, Colombia en las coordenadas geodésicas 3° 23'09.1"N 76°32'39.6"W y 3°21'01.0"N 76°32'14.1"W.

11 de marzo de 2020