

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Estudio de la Cinética de Degradación Bajo Carga Mecánica de un Polímero Implantable**

**Karina Valbuena Reyes**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería, Departamento de Mecánica y Mecatrónica  
Bogotá D.C., Colombia  
2018



# **Estudio de la Cinética de Degradación Bajo Carga Mecánica de un Polímero Implantable**

**Karina Valbuena Reyes**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ingeniería - Materiales y Procesos**

Directora:

Ph.D., M.Sc., Q.F. Bibiana Margarita Vallejo Díaz

Codirector:

Ph.D., M.Sc., I.M. Carlos Julio Cortés Rodríguez

Línea de Investigación:

Biomateriales y Fabricación Médica

Grupos de Investigación:

Grupo de Investigación en Biomecánica

Grupo de Investigación en Procesos de Transformación de Materiales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Mecánica y Mecatrónica

Bogotá D.C., Colombia

2018



*(Dedicatoria)*

*Para mis seres queridos*



## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a las siguientes personas e instituciones ya que sin su ayuda y apoyo, esta investigación no habría sido posible:

A la Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá) por darme la oportunidad de formarme como Magister en Materiales y Procesos. Por permitir que miles de colombianos tengan acceso a una educación de calidad.

Al consejo de sede de la Universidad Nacional de Colombia, a la facultad de Ingeniería y al programa de beca auxiliar docente por su apoyo económico a lo largo de mi proceso de formación. Al Ing. Edgar Espejo por confiar en mí y permitirme ser docente auxiliar en el departamento de ingeniería Mecánica y Mecatrónica.

A la directora de mi tesis de Maestría, Bibiana Vallejo Díaz, quien constante y pacientemente me guio por cerca de tres años. Y al Ing. Carlos Julio Cortés Rodríguez, codirector de mi tesis de maestría, por su apoyo para materializar esta investigación, por sus consejos, recomendaciones y excelente docencia en todo momento.

Al Grupo de investigación en Ingeniería Biomecánica, por todas sus observaciones y recomendaciones. Mi agradecimiento especial a Juan David Alarcón, Christian Silva, Alejandro Gamboa y Mara Aguilera.

Al Grupo de Investigación de Procesos de Transformación de Materiales para la Industria Farmacéutica, especialmente a la Prof. Clara Plazas y al Prof. Helber Barbosa por sus

observaciones, recomendaciones y guía. A Aura Hernández, Jonathan Tapias, Angie Vitola, Carolina Mora y Gian Carlo Pinzón por la ayuda en los laboratorios de farmacia.

A Paloma Leguizamón y Luis A. Valbuena por ser incondicionales. A Danny Gómez, Kent Wong, Cesar Bacca, Fabio Moreno, David Cortés y John Michael Correa por su ayuda. Y por último, pero no menos importante a mi familia, a quienes amo.

## Resumen

En este trabajo se caracterizaron las cinéticas y mecanismos de degradación de probetas cilíndricas y tetragonales hechas en PLGA 82-18 por el método ALM (*Additive Layer Manufacturing*, Manufactura aditiva por capas). Se realizó un ensayo *in vitro* en PBS 0,1 M a 37 °C (10 semanas) y a 50 °C (25 días) bajo condiciones de carga mecánica a compresión de 0 N, 10 N y 20 N. Durante el ensayo se observó con una significancia del 5% que la carga afecta la pérdida de masa en la probeta y cuando interacciona con el tiempo afecta la concentración de polímero en el medio junto con la porosidad, densidad, volumen y estructura macroscópica de la probeta. La cinética de degradación a 37 °C de cada tratamiento es de orden cero y sus constantes tienden a reducirse al incrementar la magnitud de las cargas. El mecanismo que se observó en todos los tratamientos fue por erosión en masa (*Bulk erosion*). Las cargas usadas durante el ensayo comprometen la estructura mecánica del dispositivo de prueba a partir de la semana 8 de degradación, limitando su aplicabilidad a rellenos mecánicos de agujeros óseos o en huesos de la mano, donde no se presentan cargas de gran magnitud.

**Palabras clave:** PLGA, cinética de degradación, espectrofotometría, carga mecánica, ALM.

## Abstract

Kinetics and mechanisms of degradation in cylindrical and tetragonal devices made of PLGA 82-18 by ALM (Additive layer Manufacturing) were characterized in this study. The *in vitro* degradation test was performed in PBS 0,1 M at 37 °C (10 weeks) and 50 °C (26 days) under compression loading (0 N, 10 N and 20 N). During the test, the compression load affected the mass loss with significance of 5% and when these loads were in interaction with time, affected the concentration of polymer in the medium along with porosity, volume, density, and macro structure of the devices. At 37 °C each treatment had zero order kinetic degradation and their constants were reduced by increasing the magnitude of the loads applied. The mechanism observed in all treatments was bulk erosion. The loads used during the test compromised the mechanical structure of the devices from the 8th week of degradation, restricting their application to mechanical filling in bone holes or in bones of the hand, where loads are not considerable.

**Keywords:** PLGA, Degradation kinetics, spectrophotometry, mechanical load, ALM.

# Contenido

	<i>Pág.</i>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Justificación.....	1
1.2 Objetivos.....	3
1.2.1 Objetivo general.....	3
1.2.2 Objetivos específicos.....	3
1.3 Organización de la tesis.....	3
<b>2. Estado del Conocimiento.....</b>	<b>5</b>
2.1 Polímeros biodegradables.....	6
2.2 Ácido Poli (Láctico-co-glicólico) (PLGA).....	10
2.3 Métodos de fabricación.....	14
2.4 Aplicaciones del PLGA.....	17
2.5 El efecto de las cargas mecánicas sobre el comportamiento del implante.....	20
2.6 Modelos matemáticos de cinéticas de liberación.....	27
<b>3. Identificación del problema.....</b>	<b>30</b>
3.1 Pregunta de investigación.....	31
<b>4. Materiales y Métodos.....</b>	<b>33</b>
4.1 Materiales y equipos usados.....	33
4.2 Caracterización de la materia prima.....	34
4.2.1 Tamaño promedio de la materia prima.....	34
4.2.2 Comportamiento térmico.....	35
4.2.3 Estructura cristalina.....	35
4.3 Fabricación de los dispositivos.....	35
4.4 Caracterización de los dispositivos fabricados.....	36
4.4.1 Verificación de dimensiones.....	37
4.4.2 Verificación de peso promedio.....	37
4.4.3 Evaluación microbiológica de los dispositivos.....	37
4.5 Montaje del ensayo de degradación.....	37
4.5.1 Preparación de medio simulado.....	37
4.5.2 Sistema de carga.....	38
4.5.3 Temperatura de trabajo.....	40
4.5.4 Razones para terminar el ensayo.....	40
4.6 Cuantificación del polímero degradado.....	41
4.6.1 Validación del método de cuantificación.....	41
4.7 Estudio de la cinética de degradación en tiempo real.....	44

4.7.1	Cambio en el peso de las probetas.....	45
4.7.2	Cambio en el volumen de las probetas .....	45
4.7.3	Cambio en la porosidad de las probetas .....	45
4.7.4	Polímero liberado al medio .....	46
4.7.5	Balance de masas .....	46
4.7.6	Diseño Experimental.....	47
4.7.7	Comportamiento térmico.....	49
4.7.8	Comportamiento cristalino .....	50
4.7.9	Cambios micro estructurales .....	50
4.7.10	Cambios macro estructurales.....	50
4.7.11	Cinética de degradación a 37 °C .....	50
4.7.12	Ajuste al modelo de Hopfenberg .....	51
4.8	Estudio de la cinética de degradación en condiciones aceleradas .....	51
4.8.1	Polímero liberado al medio .....	52
4.8.2	Cinética de degradación a 50 °C .....	52
4.8.3	Ajuste al modelo de Hopfenberg .....	52
4.9	Efecto de la temperatura en la velocidad de degradación .....	53
<b>5.</b>	<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>54</b>
5.1	Caracterización de la materia prima .....	54
5.1.1	Tamaño promedio de los pellets .....	54
5.1.2	Comportamiento térmico.....	55
5.2	Caracterización de los dispositivos fabricados.....	56
5.2.1	Verificación de dimensiones .....	57
5.2.2	Verificación de peso promedio.....	59
5.2.3	Conteo microbiológico.....	60
5.3	Seguimiento de las variables del montaje de degradación .....	61
5.4	Resultados de la validación de la técnica por espectrofotometría.....	62
5.5	Resultados de la cinética de degradación en tiempo real .....	68
5.5.1	Balance de masas .....	68
5.5.2	Resultados del análisis estadístico .....	70
	Masa perdida en las probetas .....	71
	Cambios en el volumen de las probetas .....	73
	Cambios en la porosidad de las probetas .....	74
5.5.3	Cambios en el comportamiento térmico del material .....	76
5.5.4	Cambios en la estructura Cristalina de las probetas .....	79
5.5.5	Cambios micro estructurales .....	80
5.5.6	Cambios macro estructurales.....	82
5.5.7	Cinética de degradación del ensayo a 37 °C.....	85
5.5.8	Ajuste al modelo de Hopfenberg .....	88
5.6	Resultados de la cinética de degradación en condiciones aceleradas .....	91
5.6.1	Cinética de degradación a 50 °C .....	91
5.6.2	Ajuste al modelo de Hopfenberg .....	94
5.7	Efecto de la temperatura en la velocidad de degradación .....	96
<b>6.</b>	<b>Análisis general de los resultados.....</b>	<b>99</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b>Perspectivas de investigación y recomendaciones.....</b>	<b>104</b>



## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 2-1</b>	Mecanismo de degradación de polímeros bioabsorbibles ..... 8
<b>Figura 2-2</b>	Estructura química de los dímeros y reacción de copolimerización..... 10
<b>Figura 2-3</b>	Tiempo en vida media del PLGA según relación de copolímeros ..... 11
<b>Figura 4-1</b>	Esquema del montaje de degradación ..... 39
<b>Figura 5-1</b>	Distribución del tamaño de partícula de la materia prima ..... 54
<b>Figura 5-2</b>	Termograma de PLGA en pellets sin procesar ..... 55
<b>Figura 5-3</b>	Diseño probeta cilíndrica ..... 56
<b>Figura 5-4</b>	Diseño probeta tetragonal..... 56
<b>Figura 5-5</b>	Espectros de absorción ..... 62
<b>Figura 5-6</b>	Interacción entre tiempo, geometría y carga para masa pérdida ..... 72
<b>Figura 5-7</b>	Interacción entre tiempo, geometría y carga para el cambio de volumen ..... 74
<b>Figura 5-8</b>	Interacción entre tiempo, geometría y carga para cambio en la porosidad ..... 75
<b>Figura 5-9</b>	Cambios el termograma del PLGA procesado a lo largo del ensayo..... 76
<b>Figura 5-10</b>	Cambios cristalográficos del PLGA durante la degradación ..... 80
<b>Figura 5-11</b>	Cinética de degradación de orden cero de la materia prima en el medio ..... 92
<b>Figura 5-12</b>	Cambio de la concentración de polímero degradado a 50 °C..... 94
<b>Figura 5-13</b>	Diagrama de Arrhenius de degradación del PLGA moldeado por ALM ..... 97

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 2-1</b> Esfuerzos a compresión y tensión en scaffolds de PLGA.....	20
<b>Tabla 4-1</b> Dimensiones calculadas de las probetas .....	36
<b>Tabla 4-2</b> Preparación de PBS 0,1 M .....	38
<b>Tabla 4-3</b> Cotas del esquema del montaje de degradación .....	39
<b>Tabla 4-4</b> Montaje del experimento .....	48
<b>Tabla 4-5</b> Probetas usadas para el ensayo acelerado .....	52
<b>Tabla 5-1</b> Dimensiones reales de las probetas cilíndricas .....	57
<b>Tabla 5-2</b> Dimensiones reales de las probetas tetragonales .....	58
<b>Tabla 5-3</b> Masa de las probetas fabricadas .....	59
<b>Tabla 5-4</b> Conteo microbiológico .....	60
<b>Tabla 5-5</b> Control negativo de medios de cultivo.....	60
<b>Tabla 5-6</b> Curvas de calibración por espectrofotometría.....	63
<b>Tabla 5-7</b> ANOVA para la linealidad .....	63
<b>Tabla 5-8</b> Prueba <i>t Student</i> para la linealidad .....	64
<b>Tabla 5-9</b> Coeficiente de variación de las curvas de calibración .....	64
<b>Tabla 5-10</b> ANOVA de las curvas de calibración .....	65
<b>Tabla 5-11</b> Porcentaje de exactitud entre las concentraciones teóricas y adquiridas .....	66
<b>Tabla 5-12</b> Anova para la exactitud .....	66
<b>Tabla 5-13</b> Parámetros de variación en la curva de calibración.....	67
<b>Tabla 5-14</b> Balance de masas en el experimento .....	68
<b>Tabla 5-15</b> Análisis multivariado de varianza para las variables de estudio .....	70
<b>Tabla 5-16</b> Parámetros hallados en los termogramas .....	76
<b>Tabla 5-17</b> Cambios microscópicos en el PLGA de acuerdo con el tiempo y la carga aplicada 81	
<b>Tabla 5-18</b> Comportamiento macroscópico de probetas a 0N .....	83
<b>Tabla 5-19</b> Comportamiento macroscópico de probetas a 10N .....	83
<b>Tabla 5-20</b> Comportamiento macroscópico de probetas a 20N .....	84
<b>Tabla 5-21</b> Cinéticas de degradación del PLGA en el medio .....	86
<b>Tabla 5-22</b> Velocidades de degradación a 37 °C .....	88
<b>Tabla 5-23</b> Ajuste al modelo de Hopfenberg modificado para cada tratamiento.....	89
<b>Tabla 5-24</b> Parámetros del modelo de Hopfenberg modificado para cada tratamiento ....	90

---

<b>Tabla 5-25</b>	Cinética del polímero degradado al medio a 50 <sup>o</sup> C .....	92
<b>Tabla 5-26</b>	Velocidad de degradación a 50 <sup>o</sup> C.....	94
<b>Tabla 5-27</b>	Ajuste del modelo de Hopfenberg a 50 <sup>o</sup> C .....	95
<b>Tabla 5-28</b>	Parámetros del modelo de Hopfenberg a 50 <sup>o</sup> C .....	95
<b>Tabla 5-29</b>	Variables de la ecuación de Arrhenius .....	97

**Abreviatura Término**

<i>ALM</i>	Additive layer manufacturing, manufactura aditiva por capas.
<i>D-PLA</i>	Ácido poli láctico - Dextrógiro.
<i>DSC</i>	Differential Scanning Calorimetry, calorimetría diferencial de barrido.
<i>FDA</i>	Food and Drug Administration, administración de medicamentos y alimentos.
<i>FTIR</i>	Infrared Molecular Absorption Spectroscopy with Fourier Transform, Espectroscopia de Absorción Molecular Infrarroja con Transformada de Fourier.
<i>L-PLA</i>	Ácido poli láctico – Levógiro.
<i>PBS</i>	Phosphate buffered saline, solución salina tamponada con fosfato.
<i>PCL</i>	Policaprolactona.
<i>PGA</i>	Ácido poli glicólico.
<i>PLA</i>	Ácido poli láctico.
<i>PLGA</i>	Poli L láctico co glicólico.
<i>PTX</i>	Paclitaxel, fármaco para el cáncer.
<i>SEM</i>	Scanning Electron Microscope, Microscopía electrónica de barrido.
<i>TG</i>	Thermogravimetry, Termogavimetría.
<i>GAG</i>	Glicosaminoglicanos



# 1.Introducción

En este trabajo de investigación se estudió *in vitro* el comportamiento de dispositivos biodegradables con forma tetragonal y cilíndrica hechos por ALM (*Additive Layer Manufacturing*), a los cuales se le aplicaron cargas a compresión para evaluar el efecto de estas en el mecanismo y cinética de degradación de las probetas y así poder determinar su aplicabilidad y limitaciones. Los resultados permitieron evaluar el método de manufactura empleado y aportaron información al estado del conocimiento en lo referente al comportamiento del material empleado.

## 1.1 Justificación

Durante los últimos años las técnicas de regeneración ósea han usado polímeros biodegradables en sus procedimientos mostrando buenos resultados para la rehabilitación del paciente, como por ejemplo la eliminación de segundas cirugías y reducción de los tiempos de recuperación. Esto ha fomentado la investigación de métodos de manufactura que elaboren estructuras que favorezcan el crecimiento celular, y también ha incrementado el interés por conocer cómo estos materiales se comportan mientras se degradan.

Teniendo en cuenta lo anterior, en esta investigación se fabricaron probetas cilíndricas y tetragonales por ALM debido a que este método de manufactura permite hacer geometrías complejas e individualizadas que evitarían la remoción de tejido óseo para que una pieza prefabricada ajustara adecuadamente en el lugar de implantación. Así mismo, este método elabora estructuras tridimensionales con poros interconectados que permiten el crecimiento y proliferación de células. De igual manera, permite trabajar el material como lo entrega el

fabricante sin necesidad de formar filamentos ni usar solventes o excipientes. Por último, al ser un método no convencional, aporta información al estado del conocimiento sobre sus ventajas y limitaciones.

El polímero que se usó en este trabajo fue el PLGA 82:18 debido a que está aprobado por la FDA y es un polímero sintético, lo cual garantiza cierta reproducibilidad en su fabricación, y control en su desempeño. Así mismo es un material termoplástico que se puede moldear por ALM; y aunque este polímero se ha estudiado ampliamente en el área farmacéutica específicamente en dispositivos de liberación controlada de sustancias con actividad terapéutica, aún no ha sido suficientemente caracterizada la cinética y el mecanismo de degradación en implantes fabricados con el método seleccionado y orientados al sistema óseo. En cuanto a la relación de polímeros constituyentes se eligió 82% láctico y 18% glicólico, ya que esta relación se ha usado tradicionalmente en implantes óseos debido a su dureza y propiedades mecánicas (López, 2011).

Al evaluar el material, la geometría y su método de fabricación, se deben evaluar las cargas mecánicas durante el uso del dispositivo teniendo en cuenta que el proceso de curación del hueso es muy sensible a las condiciones de carga inicial después de la cirugía (Mehboob y Chang, 2014). Para esta investigación, las cargas que se trabajaron se seleccionaron de acuerdo con los ensayos pilotos realizados, es decir, se seleccionaron cargas que no deformaran ni dañaran la estructura abruptamente al inicio del ensayo de degradación, recordando que el objetivo del dispositivo era ayudar estructuralmente al crecimiento de tejido óseo sin ser este un soporte de fijación.

Finalmente, al tener la experiencia y los resultados del proceso de producción y caracterización realizado en esta investigación, se tendrían bases sólidas aunque no suficientes para implementar la fabricación de estos dispositivos en Colombia, partiendo del hecho que las lesiones óseas y puntualmente los trastornos degenerativos osteoarticulares, ocupan un lugar importante dentro de las causas de enfermedad e incapacidad en la población colombiana (Clavijo, Alfonso, Cardozo, Casadiego y Perea, 2010) y de estas lesiones, las que actualmente se atienden y requieren un procedimiento que implique un dispositivo implantable biodegradable, el 100% utilizan dispositivos importados (Lista de registros

vigentes de dispositivos médicos Invima, 2017). Lo anterior deja en claro que hay una necesidad en el país que a nivel local se puede atender.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

Estudiar la cinética de degradación de un polímero implantable y biodegradable con geometrías definidas bajo condiciones de carga mecánica específicas.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

1. Estudiar el mecanismo de degradación de un polímero implantable, biodegradable y de geometría definida *in vitro* ante condiciones de carga mecánica específicas.
2. Evaluar el efecto de la carga en la cinética de degradación de un prototipo de dispositivo implantable.

## **1.3 Organización de la tesis**

La estructura propuesta en este documento consistió en 8 capítulos que presentan los componentes empleados para realizar el presente trabajo de investigación.

Primero se revisó el estado del conocimiento en el capítulo 2, en cada uno de los temas principales relacionados con el estudio de polímeros implantables y biodegradables aplicados en la regeneración ósea; y con base a la información analizada, en el capítulo 3, se presentó una descripción formal del problema y la pregunta de investigación que se resolvió en este estudio para aportar una solución al problema observado.

En el capítulo 4 se describieron los recursos empleados y cómo se llevó a cabo la investigación; para su formulación se tuvo en cuenta la medición de variables que explicaran cómo se comportó el material bajo la forma que se le dio y los estímulos a los que estuvo sujeto.

En el capítulo 5 se presentaron los resultados obtenidos y en el capítulo 6 se realizó el análisis para determinar el efecto de la carga en la cinética de degradación y cómo fue el mecanismo de degradación de los dispositivos de prueba. El capítulo 7 refleja las conclusiones más importantes de la investigación y finalmente en el capítulo 8 se sugirieron enfoques que se deben desarrollar para entender mejor los fenómenos y los comportamientos que presentan los polímeros biodegradables en aplicaciones médicas.

## 2. Estado del Conocimiento

Los esfuerzos por regenerar o reemplazar los tejidos del cuerpo humano manteniendo su funcionalidad tienen orígenes en el siglo XVII con el uso de injertos animales y humanos; y su evolución se ha basado en cuatro generaciones que se pueden describir en base al comportamiento que se esperaba obtener del material una vez era implantado en el cuerpo: la primera generación buscó reemplazar las propiedades mecánicas del tejido, sin que el material reaccionara biológicamente con el medio; después, en la segunda generación el objetivo consistió en lograr pasividad en el material bajo una reacción controlada con el tejido; en la tercera generación se cambió la premisa al buscar que fuera el material el que se adaptara al cuerpo; y actualmente en la cuarta generación, el objetivo consiste en lograr la interacción e integración del material en el medio, generando una respuesta celular apropiada que permita el crecimiento tisular y el transporte de nutrientes, factores de crecimiento y agentes terapéuticos en tiempos específicos sin afectar el cuerpo humano; estos materiales se denominan materiales inteligentes (Clavijo et al., 2010; Plazas y Perilla, 2011).

Los materiales inteligentes poseen propiedades que se pueden modificar de manera controlada por medio de un estímulo externo, como es el caso de los polímeros biodegradables; los cuales, ante productos químicos reactivos, enzimas, incrementos de temperatura, estrés mecánico, estímulos lumínicos (luz visible y UV) y ambientes biológicos, cambian sus propiedades físicas y químicas (Rojas, Vallejo y Perilla, 2008).

A continuación se mencionan los polímeros más usados en la regeneración ósea, cómo se procesan para formar dispositivos médicos y cómo funcionan *in vivo* e *in vitro* bajo diferentes condiciones y estímulos. Lo anterior considerando que si bien la regeneración ósea se da por sí misma para reconstruir defectos y fracturas en el hueso, esta no es posible si hay grandes volúmenes de masa ósea comprometidos, como ocurre en el caso de tumores o infecciones.

## 2.1 Polímeros biodegradables

Un polímero biodegradable es aquel material compuesto de macromoléculas que bajo ciertas condiciones ambientales, como lo son concentración iónica, temperatura o cargas mecánicas, va perdiendo paulatinamente peso molecular y masa generando así una pérdida de sus propiedades físicas y químicas iniciales.

El anterior comportamiento presenta ventajas al utilizar este material en implantes; algunas de estas son: evitar las segundas cirugías, eliminar los artefactos en las imágenes de resonancia y tomografía computarizada, y reducir el escudo de esfuerzo *stress shielding*, ya que transfiere la carga progresivamente al hueso que se está curando (Balestro, Young, Maccioni y Walch, 2015). Además, estos polímeros han demostrado potencial para soportar el crecimiento de osteoblastos y desarrollo de tejido para reparación ósea (Sabir et al., 2009; Sultana, 2012).

Estos polímeros se dividen en tres grandes grupos de acuerdo con su origen: obtenidos naturalmente, por fermentación y obtenidos sintéticamente. Los primeros se clasifican en polisacáridos y proteicos (Avérous y Pollet, 2012), son usados para elaborar materiales multifásicos, pero no se usan frecuentemente como implantes por su dificultad para ser controlados y reproducibles, por su resistencia mecánica débil (Rezwan, Chen, Blaker y Boccaccini, 2006; Zilberman, 2011; Chien-Chi y Anseth, 2013) y porque requieren procesos de remoción de antigenicidad y decelularización, debido al alto riesgo asociado a la transmisión de patógenos (Burdick, Mauck y Robert, 2011). Sin embargo, estos polímeros tienen baja toxicidad, bajos costos de operación y buen comportamiento biológico. Algunos de estos polímeros son el colágeno, alginato, celulosa y quitosano, se utilizan en la reparación y regeneración del hueso y cartílago en unión con otros compuestos (Puppi, Chiellini, Piras y Chiellini, 2010).

Los polímeros producidos a partir de microorganismos como el polihidroxialcanoato (Rezwan et al., 2006) o el ácido poli glutámico tienen otras aplicaciones con respecto a los polímeros de origen natural; por ejemplo, el ácido poli glutámico se usa para mejorar las propiedades del quitosano en ingeniería de tejidos, pero no es aplicado para sistemas de fijación ósea porque

no cumple las propiedades mecánicas y su alto costo de producción no compensa su productividad (Bajaj y Singhal, 2011).

En cambio los polímeros biodegradables sintéticos son reproducibles, uniformes, controlables, permiten modificar y adaptar la velocidad de degradación por medio de reacciones químicas y térmicas similares a las que se dan en el cuerpo humano; y en algunos casos al ser funcionalizados, pueden mejorar sus propiedades biológicas (Zilberman, 2011). Además, no presentan problemas referentes a la inmunogenicidad y al tener estructuras sencillas y bien conocidas se convierten en una fuente de materia prima confiable (Sabir, Xu y Li, 2009). Estos se clasifican en poli (propil fumarato), pseudo poli (amino ácidos), ácidos polihidroxi, poliuretano, poli anhídridos y poli  $\alpha$  esterés.

Los polímeros sintéticos tienen múltiples clases, sin embargo en esta investigación solo se consideraron las de mayor interés para aplicaciones óseas teniendo en cuenta biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad, propiedades mecánicas similares al lugar de implantación, requerimientos de transporte, y posible entrega de biofactores para mejorar la adhesión celular, proliferación y diferenciación. Así mismo, se tuvo en cuenta que el material permitiera una fabricación automatizada, algún método de esterilización previo a su implantación (Rojas, Vallejo y Perilla, 2008; Billiet, et al., 2012), y que estuviera aprobado por la FDA.

Teniendo en cuenta lo anterior sobresalen principalmente el ácido poli láctico, el ácido poli glicólico y el copolímero de ácido láctico-glicólico (PLGA) (Callén, 2009; Sabir et al., 2009), el cual se trabajó en esta investigación.

Cuando estos polímeros se degradan experimentan una pérdida de masa que puede ser por erosión superficial o por erosión en masa (*Bulk*), aún no se sabe porqué los polímeros erosionan de una forma o de la otra, pero el tipo de erosión que ocurre (**Figura 2-1**) depende de la difusividad del agua dentro de la matriz del polímero, de la rapidez de la degradación de los grupos funcionales del polímero y de la geometría de la matriz (Burkersroda, Schedl y Göpferich, 2002).

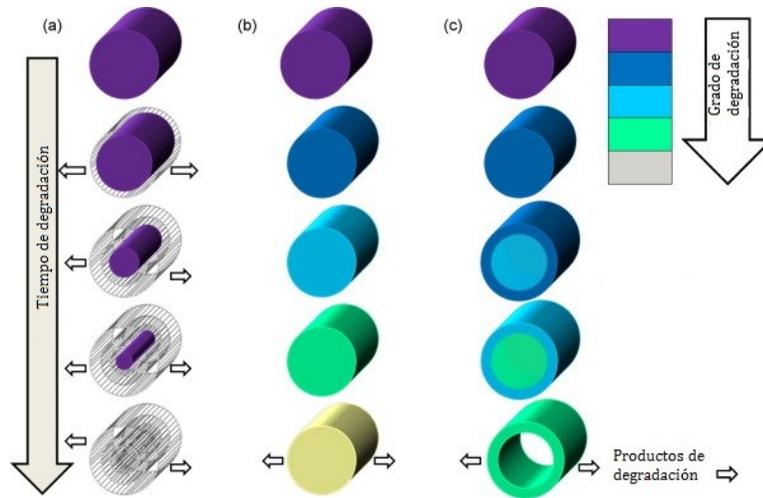
**Figura 2-1** Mecanismo de degradación de polímeros bioabsorbibles

Figura adaptada de Felfel, 2013. a) Erosión superficial. b) Erosión en masa y c) degradación a granel y autocatálisis.

En el caso de los polímeros que erosionan superficialmente, la erosión se lleva a cabo a una rapidez constante en cualquier punto del proceso (**Figura 2-1 a**); en cambio para los polímeros que erosionan en masa, como es el caso del PLA y PLGA, la velocidad de erosión no es constante, normalmente no erosionan por largos periodos hasta que la erosión se establece espontáneamente (**Figura 2-1 b**). Es decir, si la difusión de agua dentro del polímero es más rápida que la degradación de los enlaces del polímero, el polímero experimentará erosión en volumen, porque la degradación no está confinada a la superficie del polímero. Pero si la degradación de los enlaces es más rápida que la difusión de agua, el polímero se consumirá por la hidrólisis de sus enlaces en la superficie y se evita así la difusión en el volumen de la matriz. Esto se ha identificado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* donde se observa una degradación heterogénea en dispositivos de gran tamaño; esta degradación se caracteriza por una velocidad de degradación en el centro del implante mayor que la velocidad en la superficie de este (**Figura 2-1 c**) (Anderson y Shive, 2012).

Referente al peso molecular del polímero, Kamei y sus colaboradores trabajaron dos pesos moleculares (mol wt 10000 y 20000) del copolímero D, L láctico co-glicólico y observaron que el polímero de peso molecular 10000 se degradaba dos veces más rápido que el polímero de 20000 y tenía un tiempo de degradación de 8 días mientras que el segundo tardó 18 días en degradarse. También observaron que el ácido glicólico desapareció más rápido que el ácido láctico durante el proceso de degradación (Kamei et al., 1992).

Otra variable que permite observar cómo se lleva a cabo la degradación en este polímero es la cristalinidad, que incrementa junto con la resistencia mecánica inicial del implante mientras el polímero se degrada; sin embargo, una resistencia inicial alta no necesariamente implica una retención de las propiedades mecánicas por un periodo mayor. De hecho, una degradación rápida de la parte amorfa del polímero en un implante semi-cristalino tiende a debilitar todo el sistema, generando pequeños residuos cristalinos. Anderson y Shive, 2012, argumentan que un aumento de la cristalinidad vuelve el material más resistente a la hidrólisis, esto es causado por un aumento en la movilidad de las cadenas del polímero parcialmente degradadas, debido a un mayor grado de entrelazamiento que permite un realineamiento de las cadenas a un estado cristalino más ordenado.

Unido a lo anterior se encuentra la rapidez de degradación del polímero, la cual se ve influenciada por la porosidad, la composición del copolímero, la autocatálisis debida a los productos de degradación ácidos dentro del implante, y a la presencia de fármacos u excipientes como colorantes o plastificantes que dependiendo del método de fabricación podrían modificar la rapidez de la degradación.

En las investigaciones de Estupiñán et al., 2011 se fabricaron películas de PLA y PGA con recubrimientos de hidroxiapatita (HAP) sintetizada y evaluaron la degradación de estos dos polímeros en fluido corporal simulado, encontrando que hubo una menor pérdida de masa en el PLA/HAP y que la degradación y formación de poros superficiales en el material causaron una transición del comportamiento capacitivo en el fluido corporal simulado a uno resistivo. Lo anterior permitió evaluar la variación de masa y el hinchamiento del material mientras estaba en el medio fisiológico simulado.

## 2.2 Ácido Poli (Láctico-co-glicólico) (PLGA)

Este copolímero pertenece a los poli  $\alpha$ - hidroxí ésteres (Lin y Anseth, 2009) y sus polímeros constituyentes determinan en gran medida la interacción que tienen con el medio. El PGA al carecer del grupo metilo es más hidrófilo y por tanto más susceptible a hidrólisis mientras que el PLA al ser más hidrófobo que el PGA por tener el grupo metilo en la molécula del ácido láctico reduce la velocidad de hidrólisis en comparación con el PGA (Ver **Figura 2-2**). Por otro lado, el PLA tiene dos isómeros ópticos, levógiro y dextrógiro, el primero es semicristalino y es usado en aplicaciones en las que se requiere alta fuerza mecánica y dureza, como lo son dispositivos ortopédicos (López, 2011). Este copolímero se obtiene por policondensación o por polimerización por apertura del anillo de los correspondientes dímeros heterocíclicos láctico y glicólico (López, 2011).

**Figura 2-2** Estructura química de los dímeros y reacción de copolimerización.

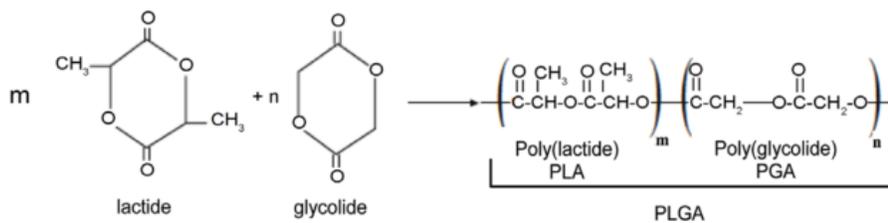


Figura tomada de Coêlho et al., 2014.

El PLGA es un polímero termoplástico, que está aprobado por la FDA y ha sido extensamente estudiado y evaluado en dispositivos de liberación controlada de medicamentos y en aplicaciones clínicas relacionadas con ingeniería de tejidos (Burkersroda et al., 2002; Yang et al., 2008). El PLA, PGA y sus copolímeros son biodegradables, biocompatibles y bioabsorbibles porque sus productos de degradación se eliminan en el organismo a través del ciclo metabólico de Krebs en forma de dióxido carbono y agua (Yang et al., 2008; Callén, 2009; Coêlho et al., 2014; Balestro, 2015). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la acumulación de estos productos puede inducir una inflamación libre de bacterias alrededor de los tejidos circundantes que están siendo reparados (Yang et al., 2008).

El PLGA tiene un rango de tiempo amplio para degradarse y su degradación se da por hidrólisis mediante la escisión de sus enlaces éster en oligómeros y por último en monómeros (Yang et al., 2008; Makadia y Siegel, 2011). Debido a que su temperatura de transición vítrea está por encima de la temperatura corporal ( $37^{\circ}\text{C}$ ), exhibe una estructura de cadena rígida y la mayoría de la bibliografía lo reporta como amorfo. Por otro lado, su mecanismo de degradación se da por erosión en masa (Hutmacher, 2000; Coêlho et al., 2014). De igual manera algunas investigaciones han demostrado que estos polímeros retienen por más tiempo su parte amorfa durante la degradación, teniendo un mejor desempeño para aplicaciones biomédicas (Larrañaga, Aldazabal, Martin y Sarasua, 2014).

Las propiedades mecánicas y de degradación de este polímero son ajustables al poder controlar el peso molecular del polímero o la forma y estructura de la matriz (Nair y Laurencin, 2007). De igual manera la relación de polímeros constituyentes del PLGA influyen en la degradación (Maurus, Kaeding, 2004; Yang et al., 2008; Coêlho et al., 2014), cuanto mayor sea el contenido de ácido glicólico, menor será el tiempo de degradación (**Figura 2-3**); una excepción a esta regla es el copolímero con monómeros 50:50, que presenta una degradación más rápida, de aproximadamente dos meses (Callén, 2009). Adicionalmente en este estudio se encontró que el PLGA no necesita condiciones específicas de temperatura para su conservación, ya que el comportamiento de muestras secas y refrigeradas fue el mismo durante varias semanas (Callén, 2009).

**Figura 2-3** Tiempo en vida media del PLGA según relación de copolímeros

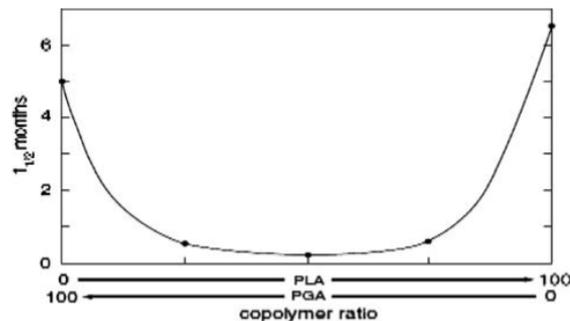


Figura tomada de Sabir, Xu y Li, 2009.

La porosidad del implante es de gran importancia ya que al tener este un área de superficie mayor, la bioabsorción mejorará, el crecimiento celular se estimulará dentro de la matriz y la unión con el tejido será más fácil; la porosidad también favorece la difusión de oligómeros y productos de degradación de bajo peso molecular, lo cual a su vez contribuye a la degradación autocatalítica del polímero (Anderson y Shive, 2012); teniendo en cuenta lo anterior, la degradación autocatalítica del implante se podría controlar de acuerdo a la porosidad del implante.

En la investigación de Rezwan et al., 2006, mencionan que la porosidad del implante afecta el comportamiento del dispositivo y que este debe tener una interconectividad entre poros controlada de más o menos 90% con un tamaño del poro de 10  $\mu\text{m}$ . Adicionalmente, se discute la incursión de biomoléculas como células y factores de crecimiento en el polímero, para acelerar el proceso de sanación, aclarando que hay una limitante en cuanto a las temperaturas de fabricación del polímero ya que estas podrían dañar las biomoléculas.

Maurus y Kaeding en el 2004, concluyen que materiales como el L-PLA y el copolímero de D-PLA/L-PLA pierden un 20% de la fuerza en los primeros 20 minutos de ser implantado, esto debido a la viscosidad del material. Por otro lado, definen que los copolímeros al tener una estructura más desorganizada por lo general se degradan más rápido, pero sacrifican propiedades mecánicas al no ser cristalinos. En cuanto a la porosidad y al área superficial encontraron que si el material no es poroso, los productos de degradación pueden quedar dentro del implante generando una aceleración de la degradación por hidrólisis llamada autocatálisis (Zolniky Burgess, 2007).

Nair y Laurencin, 2007 mencionan que el PLGA presenta dos situaciones no deseables debido a su degradación en masa (Bulk), la primera es que las matrices fabricadas con este polímero tienen la dificultad de lograr cinéticas de liberación de orden cero y la segunda es que puede desnaturalizar proteínas si es usado como un vehículo de liberación, debido a su erosión en masa y los productos ácidos de la degradación pueden desnaturalizarlas.

En la investigación de Burkersroda et al., 2002, se desarrolló un modelo teórico que permite determinar el mecanismo de erosión de matrices hechas con polímeros biodegradables

insolubles en agua, como lo son el PLA y el PLGA. Lo anterior dependiendo de la difusividad del agua en la matriz, la velocidad de degradación de los grupos funcionales del polímero y de las dimensiones de la matriz, es decir, del ajuste que se realice en  $L$  (longitud crítica de la matriz) y la relación  $\lambda/Deff$  ( $\lambda$  siendo la constante de velocidad de primer orden y  $Deff$  la difusividad dentro del polímero). Los investigadores llevaron a cabo ensayos *in vitro* para corroborar los hallazgos del modelo fabricando cilindros con estos materiales.

En el estudio se planteó que una matriz polimérica de PLGA, de la cual se espera tenga una erosión en masa, puede erosionarse superficialmente si  $L$  y  $\lambda/Deff$  incrementan. Esto significa que las matrices muy grandes ( $L > 10^{-1} m$ ) van a presentar una erosión superficial independiente del tipo de polímero del que estén hechas, a diferencia de las matrices que sean de menor tamaño ( $L < 10^{-1} m$ ), las cuales experimentarán erosión superficial cuando la difusividad del agua en la matriz sea baja o la reactividad de los enlaces del polímero con respecto a la hidrólisis sea alta.

Para lograr lo anterior, los autores incrementaron el valor de  $\lambda$  por catálisis ya que la hidrólisis de los enlaces éster se ve afectada significativamente por la variación del pH, que se trabajó a pH 2 y 13; se observó que con un pH ácido no fue posible estimular la degradación ni la erosión, permitiendo concluir que la autocatálisis no es el único factor que determina los perfiles de erosión en masa del PLA y PLGA, porque la degradación a pH 2 no genera un gradiente de pH, que si se genera cuando el medio tiene un pH de 7,4. Por el contrario los cambios son significativos cuando el medio de degradación tiene pH 13.

En el 2014 Coêlho, et al., sintetizaron PLGA 82:18 y le dieron forma de varillas usando una espátula y una superficie a 80 °C, estas varillas se degradaron en PBS a 37 °C; los autores caracterizaron la degradación de este polímero por medio de DSC, TG, FTIR, reometría, y SEM. Determinaron que a medida que el polímero se degrada pierde estabilidad térmica, es decir, la temperatura de transición vítrea en las varillas cambio de 45 °C a 17 °C después de 28 días de degradación. Referente a los cambios superficiales, se observó al inicio de la degradación que las varillas tenían integridad y apariencia no porosa, al estar 12 días inmersas en PBS se observaron pequeñas grietas en la superficie de las varillas. Los resultados permitieron determinar que después de 28 días la degradación se volvía más pronunciada; adicionalmente

mencionan que la degradación se puede acelerar si el pH del medio está por debajo de 7,4 y hasta 2,5.

## 2.3 Métodos de fabricación

Existen técnicas convencionales para fabricar implantes con estructura 3D como lo son *freeze drying solid free-form fabrication*, *solvent casting*, *particulate leaching*, *gas foaming* y *microsphere sintering* (Puppi, Chiellini, Piras y Chiellini, 2010; Igwe, et. al, 2011; Hee, Seok, Wook, Lee, Gyu Cha, Lee, y Hwan, 2012; Okamoto y John, 2013); las cuales generan implantes con estructura reticulada, pero con baja estabilidad estructural y poca repetibilidad; además de ser poco flexibles en el tamaño y la forma del implante.

Debido a lo anterior se siguen desarrollando técnicas que superen las limitaciones de las técnicas convencionales, mejoren el desempeño del implante o se acerquen más a la anatomía individual de cada paciente como es el caso del prototipado rápido, *shape deposition manufacturing*, *fused deposition modelling*, *impresión 3D*, *selective laser sintering*, estereolitografía, (Dorati, et al, 2011). Estas técnicas junto con las convencionales se han estudiado y mejorado durante décadas, permitiendo comprobar que son numerosas las variables que tienen efecto directo e indirecto sobre el desempeño de un implante.

Por ejemplo, en la investigación de Chen y Ma, 2006 se evaluó el efecto del área superficial en la velocidad de degradación del PLLA en forma de espumas de nano fibras (NF) y espumas sólidas (S) elaboradas con la técnica *phase separation* durante 15 meses *in vitro*; el área superficial inicial de las espumas NF era 80 veces mayor que el de las espumas S y al final del ensayo las espumas NF conservaron el 17% del área inicial en comparación con las espumas S que permanecieron constantes a lo largo del ensayo. La masa molar cambió en ambas espumas, pero la degradación fue mayor en las espumas de NF. En cuanto a la pérdida de masa, las espumas de NF perdieron un 51% y las espumas S solo un 6% al finalizar los 15 meses. Cabe mencionar que las espumas de NF perdieron masa hasta la semana 12 y después esta variable se mantuvo constante. En cuanto al análisis de las curvas de DSC del grupo de espumas que presentaron degradación, se evidenciaron productos de degradación ya que había picos

adicionales a las temperaturas de transición y fusión. Los resultados permitieron concluir que las áreas superficiales grandes permiten acelerar la velocidad de la degradación hidrolítica.

En el trabajo de investigación de McConville, Tawari y wang en 2015, se elaboraron mili-varillas de 1mm de diámetro con PLGA 50:50 y Disulfiram (DSF) para el tratamiento de glioblastoma multiforme mediante inyección estereotáctica. Las técnicas de elaboración fueron *Hot Melt Extrusion* (HME) y Moldeo por Inyección (MI). Los resultados demuestran que la estabilidad y el estado físico del DSF dentro de las mili-varillas de PLGA depende de la técnica de fabricación, para el caso de las mili-varillas hechas por HME muestran una estructura amorfa en comparación con las hechas a partir de MI que retienen la cristalinidad del fármaco entre un 54 a 66%. En el estudio se concluye que las mili-varillas hechas a partir de MI se degradan más rápido que las hechas a partir de HME, porque estas últimas tienen menos poros, además las estructuras no van a tener los mismos microporos, cristalinidad o peso molecular final debido a que se fabricaron con diferentes procesos por esto observaron diferentes velocidades de degradación.

De igual manera mencionan que en el primer día de degradación se observa un efecto *burst* en las mili-varillas hechas por IM pero no en las hechas por HME, esto se debe a que el fármaco en la superficie de las mili-varillas de MI se libera inmediatamente, mientras que las mili-varillas de HME no tienen fármaco en la superficie, ya que el DSF se ha dispersado en el PLGA por las altas fuerzas de cizalla en el proceso de extrusión. Ninguna de las varillas de IM exhibe una liberación en tres tiempos (tres comportamientos diferentes durante la degradación) debido a que el DSF se disuelve en la superficie dejando numerosos poros que permiten al medio de liberación embeberse en las mili-varillas y, posteriormente, el DSF que está dentro de la mili-varillas se difunde hacia afuera de una manera independiente de la velocidad de degradación del polímero.

En el trabajo de Lehtonen, Tuominen y Hiekkänen, 2013, se elaboraron scaffolds usando el proceso de *melt impregnation* en PLDLA reforzado con tres clases de fibra de vidrio, las cuales estaban compuestas por  $Na_2O$ (mol.%),  $CaO$ (mol.%),  $MgO$ (mol.%),  $B_2O_3$ (mol.%),  $Al_2O_3$ (mol.%),  $P_2O_5$ (mol.%) y  $SiO_2$ (mol.%) en diferentes proporciones. Al evaluar el mecanismo de degradación en fluido corporal simulado a 37 °C, los scaffolds presentaron erosión en masa y superficial controlada por la tasa de difusión durante las primeras semanas,

---

pero luego las velocidades de reacción de degradación eran los factores dominantes; en todos los tratamientos observaron una cinética de degradación de primer orden.

En el trabajo de Hee et al., 2012 se fabricaron implantes 3D de PLGA altamente porosos (Cerca del 90%) usando el método de *electrospinning* unido a un baño de coagulación de metanol y partículas de NaCl. Esto permitió obtener una estructura interconectada que facilitó la migración y proliferación de células, pero comprometió la estabilidad estructural y de forma del scaffold.

Otro método de fabricación usado para elaborar implantes es la deposición de baja temperatura (LDM). Yang, Cui, Xiong, Lui, Bei y Wang en 2006, la usaron con PLGA 70:30 y TCP (*Tricalcium phosphate*) para formar un material compuesto y así fabricaron implantes que se degradaron durante 22 semanas a 37 °C. Los ensayos de degradación *in vitro* se dividieron en dos grupos, PLGA con TCP y sin TCP, este último fue el grupo control y sus scaffolds se hicieron con la técnica *particle leaching*; en ambos grupos se usó LDM para darles forma de cubo. Los parámetros para comparar estos dos grupos fueron cambios en el pH del medio, morfología, propiedades mecánicas, peso y distribución molecular. El pH del medio fue mayor en el material compuesto PLGA/TCP, esto ocurrió porque el TCP es alcalino y neutralizó la acidez generada por el PLGA en el medio; sin embargo, a medida que se llevaba a cabo el experimento, los medios en ambos grupos se volvieron más ácidos.

En cuanto a los cambios de volumen se observó que al inicio hubo una reducción y luego un incremento lento en las dimensiones. Los autores explicaron que este comportamiento pudo darse debido los procesos que ocurren durante la fabricación de los scaffolds; por ejemplo, la extrusión genera una contracción en el dispositivo, entonces al existir una tensión de contracción, el implante tiende a relajarse en el medio de degradación que es libre de tensiones; eso también pudo ocurrir por la pobre hidrofiliidad del PLGA. Referente al cambio de peso molecular, este se reduce durante el ensayo, contrario a la distribución de peso molecular que aumentó en un inicio y luego se redujo. Referente a la morfología concluyen que la porosidad mostró una tendencia de cambio muy similar a la del volumen. En cuanto al módulo de compresión observaron que incrementó en las primeras semanas y en el transcurso de las semanas 10-16 se redujo de 9,2 a 1,5 MPa.

Por último, el método de esterilización también se debe incluir en el método de fabricación ya que puede afectar los resultados finales del implante. Para los implantes hechos a partir de polímeros degradables se descarta la esterilización por autoclave o calor seco ya que degradan el material considerablemente. Por lo general se esteriliza por radiación gamma, haz de electrones o por plasma, aunque este último es menos común. Keles, Naylor, Clegg y Samon, 2015 estudiaron el impacto que tenía irradiar con rayos gamma (25 kGy) PLGA sobre su velocidad de hidrólisis y morfología; encontraron que las unidades de láctico y glicólico tenían velocidades de degradación diferentes y que estas velocidades incrementaban en función del incremento de la dosis irradiada; en cuanto a la superficie de las muestras, encontraron que estas se volvían más rugosas entre mayor fuera la dosis. Por otro lado, Loo, Ooi y Boey, 2004 irradiaron películas de PLGA con haz de electrones (2,5 a 100 Mrad) para evaluar el efecto que tenía esta técnica de esterilización sobre el polímero, el principal resultado fue que las películas se volvieron frágiles y el peso molecular del polímero se redujo al incrementar la dosis, lo cual afectó las temperaturas de transición y fusión del material.

## 2.4 Aplicaciones del PLGA

Una de las aplicaciones más conocidas de este polímero son los dispositivos de fijación ósea, especialmente los tornillos de interferencia que se usan para fijar autoinjertos hueso-tendón-hueso; por lo general se fabrican usando la técnica de moldeo por inyección y se trabajan diferentes pesos y distribuciones de peso molecular para ajustar el tiempo de reabsorción.

En el 2006 Bailey, Kuiper y Kelly investigaron el desempeño de un tornillo de fijación elaborado a partir de PLGA e hidroxiapatita para fracturas de huesos pequeños junto con tornillos metálicos usando cargas a compresión de 19,9 N a 38,3 N y una espuma de poliuretano rígido que representaba físicamente la superficie subcondral del hueso, no se usó ningún medio. El tornillo hecho en PLGA demostró tener buenas propiedades de compresión ya que la media de la fuerza máxima a compresión fue de 32,3 N, siendo el segundo tornillo con mejor fuerza máxima a compresión en comparación con los demás tornillos que eran metálicos.

---

En la investigación de Balestro et al. (2015) se estudió *in vivo* el efecto de tornillos de compresión hechos en PLGA 85L:15G y comercializados por Tornier TX, encontraron que el tornillo puede mantener su fuerza por las primeras 8 semanas y está diseñado para ser absorbido completamente a los 2 años, su investigación es importante porque se presenta el resultado clínico, osteólisis y grado de reabsorción después de usar esta clase de implante. En todos los pacientes, el implante se absorbió completamente a los 2 años de haber sido implantado y proponen que la hidrólisis es la responsable del incremento de la osteólisis que observaron durante el estudio clínico.

Otra aplicación bastante conocida del PLGA es la entrega de principios activos a largo plazo por medio de microesferas; Zolnik y Burgess (2007) investigaron la degradación de este polímero y la liberación de Dexametasona en microesferas de PLGA 50:50 en condiciones de pH neutro y ácido. Trabajaron dos formulaciones diferentes (Mw: 25000 y 70000) que exhibían un perfil de liberación en tres tiempos a pH 7,4 y 2,4. El estallido inicial o efecto *burst* y las fases de retraso fueron similares para ambos valores de pH, mientras que la fase de orden cero, aparente secundaria, se aceleró sustancialmente a pH 2,4. El cambio de peso molecular del polímero siguió una cinética de primer orden en ambos valores de pH. Establecieron una relación lineal entre el porcentaje de liberación del fármaco (después del efecto *burst*) y el logaritmo natural del peso molecular para las dos condiciones de pH. Los estudios morfológicos mostraron que el mecanismo de degradación del polímero cambiaba la degradación "de adentro hacia fuera" en pH 7,4 a "de afuera hacia adentro" en pH 2,4. Cuando el pH es 7,4, las microesferas siguieron los cambios morfológicos habituales, tales como el picado de la superficie y formación de poros, pero a pH 2,4 la superficie se mantuvo lisa durante todo el proceso de degradación. Las fracturas en las microesferas se atribuyeron a la cristalización de los productos de degradación oligómeros como consecuencia de la baja solubilidad a este pH. Afirman que la degradación fue más homogénea a un pH de 2,4; explican que puede deberse a que la totalidad de las microesferas experimentan un pH más uniforme a 2,4. Sin embargo, a pH 7,4, el pH local dentro de las microesferas varió considerablemente debido a una acumulación de oligómeros ácidos. Estos resultados relacionan los cambios morfológicos durante la degradación del PLGA a pH neutro y ácido, permitiendo observar un cambio en el mecanismo de degradación del polímero, pero no en la liberación del fármaco.

En el trabajo de Zolnik, Leary y Burgess (2006) se realizaron pruebas de liberación acelerada de dexametasona a temperaturas elevadas usando microesferas de PLGA producidas con 4 tipos diferentes de peso molecular (PLGA 50:50 Mw 25000, PLGA 50:50 Mw 28000, PLGA 50:50 Mw 5000 y PLGA 65:35 DL Mw 70000), las temperaturas de trabajo fueron 45, 53, 60 y 70 °C. A 37 °C las microesferas mostraron un comportamiento de degradación en tres tiempos: una liberación explosiva inicial, controlada por difusión; seguida de una fase de latencia hasta que la erosión del polímero fue suficiente y finalmente un efecto *burst* secundario con cinética de liberación de orden cero, estas últimas son dependientes de la erosión del polímero y de la difusión.

En el estudio señalan que la liberación acelerada del fármaco se puede obtener incrementando la velocidad de degradación del polímero por medio de una hidrólisis catalítica alcalina o ácida, adicionando surfactantes que estimulen la difusión del principio activo o incrementando la temperatura; a temperaturas cercanas a la temperatura de transición del polímero, los coeficientes de difusión del fármaco pueden llegar a incrementar tres órdenes de magnitud. Cuando se realizó el estudio acelerado, determinaron que este tiene correlación con las condiciones reales a las que se someterían las microesferas. Mencionan que es posible obtener una correlación de 1:1 optimizando las condiciones del ensayo acelerado, y que en los ensayos acelerados los perfiles de degradación son similares con respecto a los ensayos en tiempo real solo que incrementa la velocidad del proceso. Lo anterior no ocurre cuando se trabaja a 70 °C, ya que a esta temperatura se produce un perfil bifásico logrando una reducción de tiempo de 30 días (37 °C) a 1 día para llevar a cabo la liberación del fármaco. Adicionalmente, los investigadores encontraron que al trabajar con temperaturas altas se presentaron problemas en el montaje y mantenimiento del experimento por lo que se eliminó del protocolo de experimentación el ensayo a 70 °C.

Otros factores que se deben tener en cuenta cuando se lleva a cabo un ensayo acelerado por temperatura es que no permite predecir con precisión la fase de estallido, se observan cambios superficiales resultado de la plastificación que se genera a altas temperaturas y no debidos a la degradación. Por último, la información de las formulaciones de PLGA de 25000 y 28000 Mw resultaron ser significativamente diferentes, indicando que el método de aceleración es discriminatorio.

## 2.5 El efecto de las cargas mecánicas sobre el comportamiento del implante

El sistema óseo está expuesto a cargas de tensión, compresión, cizalla, flexión y torsión. Y dependiendo de la posición del hueso y de los movimientos del individuo, estas cargas pueden ser dinámicas o estáticas (Dorati et al., 2011). A pesar de la variedad de estímulos mecánicos presentes en el sistema óseo, la mayoría de la literatura reporta información relacionada con cargas a tensión dinámica.

En la investigación de Asti et al., 2010, determinaron los esfuerzos a compresión y tensión de scaffolds hechos de PLGA 85:15 y PLGA/HAPP (Hidroxiapatita) con la técnica *solvent/casting particulate leaching* (Ver **Tabla 2-1**); en la curva de esfuerzo deformación encontraron tres regiones lineales para el PLGA y dos regiones lineales en el caso del PLGA/HAPP. Las pruebas de tensión mostraron una sola región lineal antes del punto de fluencia y de falla. Según la información adquirida, los autores concluyeron que la presencia de HAPP en el scaffold no mejoró las propiedades a compresión, mientras que las propiedades a tensión si se mejoraron con la adición de este compuesto.

**Tabla 2-1** Esfuerzos a compresión y tensión en scaffolds de PLGA

Scaffold	Prueba a compresión			Prueba a tensión		
	Ec1 (Mpa)	Ec2 (Mpa)	Ec3 (Mpa)	Et (Mpa)	Ts (Mpa)	UTS (Mpa)
PLGA	1,66 ± 0,76	0,88 ± 0,17	3,07 ± 0,28	2,88 ± 1,44	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,03
PLGA/HA	4,76 ± 2,32	1,07 ± 0,16	—	15,68 ± 4,41	0,17 ± 0,04	0,35 ± 0,12

Tabla tomada de Asti et al., 2010. (MPa: mega pascales)

Las cargas a las que estaría expuesto un implante son de gran importancia ya que *in vivo* intervienen en la regeneración ósea y determinan en gran medida si se presenta la degeneración articular. Por ejemplo, se ha demostrado que ciertas cargas estáticas a compresión causan una reducción en la síntesis de proteoglicanos y en su liberación desde la matriz extracelular al cartílago articular, y en los casos en los que hay una compresión excesiva

este proceso de regeneración se daña por completo (Hung et al., 2003).

Una vez situado el implante, este debe prever el espacio y condiciones para que el tejido vuelva a crecer y además debe soportar las cargas y esfuerzos *in vivo* de manera temporal (Hutmacher, 2000). En efecto, el hueso se regenera bajo una carga fisiológica específica, por lo tanto, la cinética de degradación se debe controlar para que el implante pueda retener sus propiedades físicas durante el tiempo que el hueso tarda en regenerarse; después de esto comenzará a perder sus propiedades mecánicas y comenzará a ser metabolizado por el cuerpo sin generar reacción de cuerpo extraño después de 12 a 18 meses. De igual manera después de implantar un polímero en el organismo, este estará sujeto a esfuerzos no homogéneos que afectan la rapidez de la degradación local, generando concentradores de esfuerzos y consecuentemente fracturas en estos (Guo et al., 2015).

Se ha demostrado en experimentos *in vitro* como la carga puede acelerar la degradación del PLGA, y específicamente como la carga dinámica exhibe una rapidez de degradación mayor que una carga estática (Fan et al., 2007). En los experimentos donde se controla la deformación, se presentó una relajación de la tensión del polímero y un límite en su deformación, mientras que en los experimentos donde se controla el esfuerzo hubo fluencia del polímero y cambios dimensionales significativos (Deng et al., 2004).

En el trabajo de Thompson et al. en 1996, se estudiaron las propiedades mecánicas y de degradación del PLGA 50:50 en PBS a 37 °C por un periodo de 6 semanas bajo carga a compresión cíclica de 3,72N durante 0,1 segundos a una frecuencia de 0,5 Hz con 2700 ciclos por día, teniendo en cuenta que dicha sollicitación es la que se espera en un paciente de 70 Kg que camina lento durante una rehabilitación. Los resultados mostraron una diferencia significativa entre los implantes que soportaban carga cíclica y los que no, los primeros experimentaron menor reducción del peso molecular en la primera semana; luego ambos implantes mostraron una degradación lineal; referente a la pérdida de masa, en las 3 primeras semanas fue constante para los implantes con y sin carga cíclica y posteriormente no hubo diferencias significativas entre las masas de los implantes, pero los implantes con carga mostraron una tendencia a perder más masa que los que no tenían carga. Igualmente sugieren que los cambios superficiales y morfológicos en el implante fueron causados por la carga a compresión que en un inicio colapso y endureció el implante.

---

Otro factor importante que afecta el comportamiento del implante y que está fuertemente relacionado con la carga son las dimensiones del implante y consecuentemente la cantidad máxima de productos de liberación que el medio puede tolerar, ya que una cantidad muy alta puede acelerar la velocidad de degradación y aumentar la concentración de dichos productos causando toxicidad e inflamación; también puede ocurrir que la capacidad del tejido circundante de eliminar los productos de la degradación sea baja, debido a poca vascularización o actividad metabólica, entonces la composición química de estos productos podría causar perturbaciones temporales a nivel local como incremento en la presión osmótica o en el pH manifestándose a través de la acumulación de fluidos locales (Hutmacher, 2000).

En el estudio llevado a cabo por Deng, Zhou, Chen, Burkley, Xu, Jamiolkowski, y Barbolt, 2004 se evaluó el efecto de la carga y la temperatura en la degradación *in vitro* de multifilamentos de PLGA 90:10 trenzados y sumergidos en PBS; los autores determinaron que el efecto de la carga no es representativo ya que a 0,2, 0,4 y 0,8 N, las muestras se degradaron al mismo tiempo y de la misma forma. En cambio, al incrementar la temperatura de 27,5 a 47,5 °C en intervalos de 5°C, la degradación se aceleraba. De igual manera, los resultados permitieron visualizar que la degradación del polímero en términos mecánicos se lleva a cabo en tres fases. La primera consistió en un decremento repentino de la retención del módulo de tracción en función de la carga y del tiempo de inmersión; la segunda fase presentó una meseta donde no se presentan cambios significativos a lo largo del tiempo; y la tercera retomó el decremento de la retención del módulo. Esta dependencia de la degradación con la temperatura se puede describir a partir de la ecuación de Arrhenius, donde se hallan energías de activación entre 96,12 y 102,38 kJ/mol. Por último, mencionan que el cambio en el peso molecular a lo largo del tiempo obedece a una cinética de reacción de primer orden.

Posteriormente en el 2008, estos mismos autores estudiaron la degradación *in vitro* de monofilamentos de PLGA, la cual siguió un comportamiento de primer orden y mostró resultados muy similares al estudio realizado en el 2004 en cuanto al efecto que tiene el aumento de la temperatura en la degradación; por ejemplo, a los monofilamentos les tomó 12 días alcanzar una reducción del peso molecular del 80% a 37,5 °C pero solo les tomó 4 días alcanzar el mismo resultado a una temperatura de 47,5 °C. En este caso la energía de activación estuvo entre 87,3 y 92,3 kJ/mol.

En el trabajo de Fan et al., 2007 se estudiaron los efectos de una carga mecánica en una espuma de PDLLA (poli (D, L-lactida)), cuyo método de fabricación se desconoce; se determinó que este polímero se degradaba más rápido bajo la acción de una carga mecánica continua que sin carga. Además, observaron que la carga a compresión y a tensión aceleraba más la degradación que solo la carga tensil. Las fuerzas de tensión y compresión se aplicaron usando un sistema de tornillos con resortes que si bien permitió aplicar cargas de 15 a 100 N, este afectaba la precisión de la carga aplicada, y se desconoce si comprometió la estabilidad del medio donde se estaba degradando el polímero. En el estudio advirtieron que morfológicamente durante el primer mes, las espumas se hincharon y engrosaron, además comenzó a formarse un precipitado de color blanco en la solución de PBS. La superficie interior de las cavidades dejó de ser lisa y algunas paredes de las cavidades se rompieron. A los tres meses, la estructura de red de la espuma de PLGA se destruyó significativamente y se pudo observar superficies dañadas y un número mayor de precipitados de color blanco. Debido a la acción de la carga a compresión, la espuma se volvió más delgada y compacta, evidenciando el incremento del esfuerzo en el sistema. La pérdida de masa fue mayor en las espumas con carga que las que estaban sin carga.

En el trabajo de Yang et al. en el 2008 se investigó sobre la degradación *in vitro* de implantes porosos hechos con PLGA 70:30 y fosfato tricálcico- $\beta$  (PLGA/ $\beta$ -TCP) bajo carga en condiciones dinámicas y estáticas durante 12 semanas, incubando las muestras en PBS a pH 7,4 y 37 °C. Se observó durante todo el tiempo del ensayo que el pH del PBS donde estaban los implantes que tenían cargas dinámicas siempre fue mayor que los que estaban en condiciones estáticas y a partir de la semana 8 ambos disminuyeron gradualmente. Referente a la absorción de medio, esta fue mayor en las primeras cuatro semanas para los implantes que tenían carga dinámica y después hubo una saturación, esto se debe a la disolución de los productos de degradación; los implantes bajo carga dinámica presentaron una velocidad de degradación mucho más rápida que los que tenían cargas estáticas y consecuentemente sufrieron una mayor pérdida de peso.

En la semana 12, los implantes se rompieron porque no soportaron más la carga cíclica y los implantes que estaban sujetos a condiciones estáticas preservaron la forma original y consecuentemente mayor masa residual. También se observó una cantidad importante de partículas  $\beta$ -TCP en las paredes del implante durante la degradación en condiciones dinámicas,

---

mostrando una alta disolución de este compuesto en lo que quedaba del implante, debido a la rápida velocidad de degradación del PLGA.

Todos los resultados indican que la carga cíclica en condiciones dinámicas acelera la velocidad de degradación del PLGA en el implante de PLGA/ $\beta$ -TCP en comparación con las condiciones estáticas sin haber aplicado ningún tipo de esfuerzo.

En el estudio llevado a cabo por Soodeh et al., en el 2012, se diseñaron implantes con geometrías de poro cúbicas y hexagonales e igual densidad relativa usando impresión 3D por fotopolimerización, para investigar el efecto de la dirección de las cargas a compresión sobre los implantes y para determinar sus mecanismos de deformación; desafortunadamente el polímero que usaron para elaborar los implantes, FullCure 830, no cuenta con bibliografía que soporte su biocompatibilidad, toxicidad o biodegradabilidad. Sin embargo, la curva de esfuerzo deformación fue la de un material plástico elástico que después de una deformación elástica linear, comenzó a presentar una reducción en el esfuerzo seguido por una meseta de colapso, truncada por un régimen de densificación; este régimen de densificación se presentó cuando todas las capas de implante son comprimidas en la misma dirección a la que la fuerza de compresión es aplicada.

Igualmente se menciona en el estudio que las grietas se producen en la misma dirección y cuando estas generan fallas catastróficas, ocurren a  $45^{\circ}$  en los implantes con poros cúbicos y a  $30^{\circ}$  en los implantes con poros hexagonales. Una vez que la dirección de la carga a compresión se cambiaba, el comportamiento en las curvas de esfuerzo deformación también cambiaba.

En el trabajo de Guo et al. en el 2015 se implementó un ensayo *in vitro* para degradar membranas de PLGA 50:50 hechas mediante *solvent casting*; el medio de degradación fue agua desionizada y las membranas se sometieron a diferentes esfuerzos de tensión constantes (0,1-0,5 MPa). Se determinó que la degradación del polímero trabajado es muy sensible a ambientes bajo esfuerzo ya que la pérdida de peso se vio directamente influenciada por la magnitud de la carga aplicada y el tiempo de degradación. Los autores mencionan que los altos niveles de esfuerzo a tensión incrementan el espacio molecular liberando fácilmente las moléculas

pequeñas en el agua a través de la superficie; de igual manera se presentó un decremento en el módulo elástico y en la resistencia a la tracción en el grupo de probetas que se sometió a 0,5 MPa; las cuales se rompieron en varios fragmentos en la semana 8. Por último, aclaran que estos resultados solo pueden ser válidos para el polímero que se trabajó, el método de fabricación empleado y las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento.

En las investigaciones de Li, Feng, Jia, et al., 2010 se elaboraron implantes de PLGA 70:30 por *electrospun* y se sometieron a una carga a tensión constante de magnitud desconocida en PBS con pH 7,4 y temperatura de 37<sup>o</sup> C durante 7 semanas. El proceso de degradación *in vitro* bajo carga y sin ella permitió comprobar que el módulo elástico de las probetas sin carga permaneció casi constante mientras que las que tenían carga incrementó durante la primera semana casi 5,5 veces su valor original y en cuanto al esfuerzo último también incrementó durante la primera semana, pero después de esa semana se redujo rápidamente. En cuanto al peso molecular del polímero, su velocidad de degradación fue mayor en el polímero bajo carga. Así mismo, se cuantificó la degradación del polímero midiendo la cantidad de ácido láctico liberado en el medio por espectrofotometría ultravioleta, esto permitió determinar que el polímero bajo carga liberó más ácido láctico que el polímero que no tenía carga.

La degradación del polímero también se caracterizó por DSC, a medida que transcurría el tiempo, se incrementó el porcentaje de cristalinidad permitiendo comprobar que la fase amorfa del polímero era la primera en degradarse; este comportamiento fue más fuerte y definido en las probetas sometidas a carga a tensión teniendo en cuenta que la orientación molecular era afectada por la dirección de la carga. Posteriormente, al final del tiempo de degradación, las probetas redujeron el nivel de cristalinidad independientemente de estar o no bajo carga. Por último, mencionan que la carga elegida para hacer el experimento no fue suficiente para inducir por sí sola el proceso de degradación.

Estos autores (Li, Feng, Jia y Fan, 2010), también estudiaron el comportamiento de implantes de PLGA 70:30 fabricados por *electrospun* bajo cargas mecánicas de tracción continuas y estáticas de magnitud desconocida, tanto *in vitro* usando PBS como *in vivo* por 7 semanas. Se reportó el comportamiento de degradación a partir del módulo elástico y la resistencia a la ruptura; se concluyó que la carga a tracción incrementa la rapidez de degradación y reduce las propiedades mecánicas del implante permitiendo determinar que esta variable debe

considerarse cuando se diseñen implantes. Se sugirió el uso de materiales compuestos o refuerzos en zonas críticas de la geometría del implante. Referente a la morfología se observó que bajo carga, las fibras del polímero estaban más ordenadas y presentaban más rupturas en comparación a las probetas sin carga a tracción.

En el trabajo de Dreher, Nagaraja, Bui y Hong, 2013, caracterizaron las respuestas de la fluencia (creep) estática, recuperación a fluencia y fluencia cíclica en barras de PLLA y PLGA 85:15 hechas con moldeo por inyección bajo magnitudes de carga a tensión fisiológicamente relevantes de 50, 150 y 300N.

Para la caracterización monotónica las barras se ubicaron en una cámara a 37 °C con humedad relativa del 70% hasta alcanzar una masa constante, el esfuerzo último de ingeniería para el PLGA fue  $57,2 \pm 1,5$  MPa y para el PLLA fue  $54,5 \pm 2,2$  MPa. En cuanto a la fluencia estática se trabajaron 3 cargas constantes (50 N, 150 N y 300N); la primera se trabajó durante 7 horas debido a la baja velocidad de fluencia, y en las cargas mayores, la retención de la fluencia se prolongó hasta al menos 30 mm de desplazamiento axial o fractura a través de la sección transversal; para los especímenes no fracturados, este grado de desplazamiento axial correspondió entre el 170% y 230% de alargamiento en la región medida después del ensayo, suficiente para permitir cambios geométricos significativos en la muestra. Para la recuperación a fluencia trabajaron a 150 N hasta que la barra tuvo una fluencia de 1,25 mm, seguido de un periodo de recuperación sin carga, luego se volvió a aplicar la misma carga hasta que alcanzó 8 mm de fluencia y se regresó al periodo de recuperación sin carga. Como resultado de este ensayo se determinó que el tiempo de recuperación para cada material fue 2,5 veces mayor que el tiempo requerido para alcanzar 1,25 mm o 8 mm. En cuanto a la prueba de fluencia cíclica se aplicó una fuerza sinusoidal de 5 a 300N con una frecuencia de 1 Hz, 20000 ciclos. El anterior ciclo fue suficiente para causar desplazamientos de 35mm o fracturas a través de la sección transversal de las barras.

En el caso del PLGA, este exhibe un comportamiento de fluencia y de falla a cargas significativamente menores al punto de fluencia o a las propiedades finales del material, lo que permite pensar que las fallas y las deformaciones permanentes pueden ocurrir durante periodos prolongados de carga *in vivo*, inclusive en aplicaciones donde a priori se sabe que la

carga es menor al esfuerzo último del dispositivo. Los resultados confirmaron que la fluencia en ambos polímeros depende de la carga. Por último, la aplicación de carga incrementó significativamente el porcentaje de cristalinidad en ambos materiales.

## 2.6 Modelos matemáticos de cinéticas de liberación

Los principales mecanismos de degradación del PLGA son difusión y erosión. La bibliografía reporta que el PLGA se degrada por erosión, implicando esto un cambio constante de la geometría del sistema.

Existen modelos matemáticos que permiten describir el perfil de degradación del polímero y el perfil de liberación del fármaco que está albergado en el polímero. A continuación los modelos más conocidos:

**Modelo de orden Cero:** se utilizan para sistemas que no se disgregan y van liberando el fármaco lentamente, representado por la ecuación 1 (Shaikh, Kshirsagar y Patil, 2015).

$$Q_0 - Q_t = K_0 t \quad (1)$$

$Q_0$  es la cantidad inicial de fármaco,  $Q_t$  es la cantidad disuelta del fármaco en el tiempo  $t$ ,  $K_0$  es la constante de liberación de orden cero expresada en unidades de concentración/tiempo.

**Modelo de primer orden:** se utilizan en matrices porosas y se representan con la ecuación 2 (Shaikh, Kshirsagar y Patil, 2015).

$$\ln \left( \frac{C_0}{C_t} \right) = K t \quad (2)$$

$C_0$  es la concentración inicial de fármaco,  $C_t$  es la concentración del fármaco en el tiempo  $t$ ,  $K$  es la constante de velocidad de primer orden.

**Modelo de Baker-Lonsdale:** proviene del modelo de Higuchi (López, 2011) y describe la liberación del fármaco desde matrices esféricas (Ecuación 3). Se puede dar en microcápsulas y microesferas.

$$f_1 = \frac{3}{2} \left[ 1 - \left( 1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] M_t / M = K_t \quad (3)$$

Donde  $M_t$  corresponde a la cantidad de fármaco en el tiempo  $t$  y  $K$  corresponde a la constante de velocidad que es la pendiente.

**Modelo de Weibull:** puede describir distintos procesos de disolución del fármaco. Este modelo suele aplicarse con el fin de comparar perfiles de liberación de fármacos de matrices poliméricas a partir de la ecuación 4 (López Gasco, 2011).

$$M = M_0 \left[ 1 - e^{-(t-T)^{b/a}} \right] \quad (4)$$

$M$  es la cantidad de fármaco disuelto en función del tiempo,  $M_0$  es la cantidad total del fármaco liberado,  $T$  es el intervalo de tiempo medido en el proceso. Los parámetros " $a$ " y " $b$ " son la escala dependiente del tiempo y la forma de la curva de disolución.

**Modelo de Hopfenberg:** es un modelo idealizado que se basa en la erosión de un polímero y correlaciona la velocidad de liberación del fármaco con las variables tiempo y superficie del sistema (Ecuación 5), asume que el proceso puede ser, pero no necesariamente, de orden cero caracterizado por una sola constante de velocidad. Este modelo también asume que la liberación del fármaco está limitada a la erosión de la probeta e ignora los efectos de bordes. (Hofenberg 1976; Lin y Anseth, 2009; López, 2011).

$$\frac{C_t}{C_\infty} = 1 - \left[ 1 - \frac{K_0 t}{C_L a} \right]^n \quad (5)$$

Donde  $\frac{C_t}{C_\infty}$  = Fracción de polímero liberado en el tiempo  $t$ ,  $K_0$  = Constante de velocidad de orden cero, describe la degradación del polímero (Proceso por erosión superficial),  $C_L$  = Concentración inicial del sistema,  $a$  = Grosor medio del sistema (Radio del cilindro),  $n$  = Exponente que varía con la geometría,  $n=1, 2, 3$  (plana, cilíndrica y esférico, respectivamente),  $t$  = tiempo.

En la investigación de López, 2011, se elaboraron nanopartículas con PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25 para encapsular PTX por medio de Spray Drayer y doble emulsión, se caracterizaron sus

---

cinéticas de degradación obteniendo constantes de velocidad diferentes para cada método de fabricación y material empleado. Los datos obtenidos se ajustaron a los modelos matemáticos de Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Hopfenberg encontrando que bajo el mismo tratamiento, método y material, la constante de la velocidad fue diferente; adicionalmente las cinéticas fueron segmentadas en dos o tres etapas en el tiempo reportando así al menos dos constantes de velocidad por tratamiento, con esto se concluyó que durante la liberación del fármaco se pueden presentar varios mecanismos de liberación. Los  $R^2$  reportados para el PLGA 75:25-PTX fueron 0,942-0,995.

En el trabajo de Makadia y Siegel, 2011, mencionan que la degradación del PLGA es un proceso colectivo de difusión a granel, difusión superficial, erosión a granel y erosión superficial debido a que hay numerosas variables que influyen en el proceso haciendo que el patrón de velocidad de liberación no sea predecible; de igual manera el incremento de los grupos carboxilos a causa de la degradación genera una catálisis en el proceso.

### 3. Identificación del problema

De la revisión del estado del conocimiento se puede concluir que la degradación de los polímeros implantables se puede controlar de acuerdo con la escala del implante, composición de monómeros, peso molecular, método de fabricación elegido para darles forma y a las condiciones del medio externas como pH, temperatura y carga mecánica; estas últimas *in vivo* no se pueden manejar a voluntad y por tanto se deben considerar en todos los ensayos de factibilidad.

De manera análoga, la mayoría de la bibliografía consultada discute el mecanismo de degradación del material, pero no reporta cinéticas de degradación para implantes. Es decir, reporta estudios sobre cinéticas de matrices poliméricas inyectables cargadas con fármacos, pero muy pocos estudios discuten el mecanismo de dispositivos óseos implantables de tamaño milimétrico con diferentes geometrías sujetos a cargas específicas. De igual manera métodos de fabricación como el prototipado rápido, que se ha implementado en la práctica médica desde hace años, no ha sido suficientemente estudiado en lo referente a sus mecanismos y cinéticas de degradación.

Referente a los modelos matemáticos, la mayoría de estos asume varios parámetros del sistema como constantes durante la degradación, lo cual no ocurre en la práctica.

Teniendo en cuenta lo anterior, **actualmente no se conoce con precisión cómo la geometría y las cargas mecánicas específicas afectan la cinética de degradación de dispositivos elaborados para la fijación ósea hechos a partir de un polímero biodegradable.**

### **3.1 Pregunta de investigación**

¿Cuál es el efecto que tienen las cargas mecánicas específicas sobre la degradación de un polímero biodegradable con geometrías definidas?



## 4. Materiales y Métodos

En esta sección se describen los materiales, equipos y procedimientos llevados a cabo en esta investigación para estudiar la degradación del polímero con geometrías definidas bajo condiciones de carga mecánica específicas.

### 4.1 Materiales y equipos usados

Se utilizaron los siguientes reactivos de grado analítico para preparar el medio de degradación (PBS 0,1M): cloruro de sodio pureza  $\geq 99,5$  % marca Merck (Lote: K47000704 602), cloruro de potasio pureza 99 % marca Panreac (Lote: 0000676281), di- Sodio hidrógeno fosfato anhidro pureza 98,7 % marca Panreac (Lote: 0000697679), potasio di-hidrógeno fosfato pureza 99,7 % marca Panreac (Lote: 0000690571), acida sódica y agua doblemente destilada.

Los dispositivos de prueba se hicieron con el copolímero PLGA Resomer® LG 824S (Evonik, Alemania), 82 % láctico y 18 % glicólico con viscosidad intrínseca de 1,7 - 2,6 dl/g y peso molecular promedio ( $M_w=334.283$ ).

Los equipos usados en el desarrollo de esta investigación fueron:

- Baño termostatao digital referencia DB-221 marca E&Q, con rango de temperatura desde temperatura ambiente hasta  $90 \pm 0,5$  °C.
- Horno de secado al vacío digital referencia LVO-2040 marca LabTech.
- Prototipo de ALM para PLGA con velocidad de desplazamiento de 60 mm/s, temperatura del extrusor de 160 °C, temperatura de la plataforma de 50 °C, diámetro de la boquilla 0,2mm, presión de inyección 5 MPa, diseñado y ensamblado en Bogotá.
- Espectrofotómetro referencia T70 UV/VIS marca PG Instruments.
- Equipo de DSC referencia DSC-60 marca Shimadzu.

- Microscopio SEM referencia Quanta 200 marca FEI.
- Máquina para hacer recubrimientos referencia 150R marca Quorum.
- Difractómetro de rayos X referencia XPERT-PRO marca PANanalytical.
- Balanza analítica referencia XP26 marca Mettler Toledo (0 a 22 g).
- Tornillo micrométrico referencia Micromar 40EWR marca Mahr (25 a 50 mm).
- Agitador magnético referencia C-MAG HS7 marca IKA.
- Medidor de conductividad referencia Orion Star A211 marca Thermo Scientific.
- Estereomicroscopio referencia JSZ6B marca Advanced Optical.
- Microscopio óptico referencia CH2 marca Olympus.
- Máquina de ensayos universal modelo AG-IS 5KN Autograph marca Shimadzu (carga de la celda 5kN).

## 4.2 Caracterización de la materia prima

A continuación se describen los procedimientos que se llevaron a cabo para estudiar la materia prima.

### 4.2.1 Tamaño promedio de la materia prima

Para determinar el tamaño promedio de la materia prima suministrada por el proveedor se tomó una muestra, donde se midieron 300 partículas del sólido en su lado más largo en la parte que dividía por la mitad el área proyectada (Diámetro de Martin), por medio de un microscopio óptico con un lente de 4 aumentos y un ocular que se calibró con una lámina patrón de 1mm, el factor de conversión fue de 25 líneas del ocular= 0,65 mm, posteriormente se hizo el histograma de los datos recolectados.

### 4.2.2 Comportamiento térmico

Se utilizó un equipo de DSC el cual se programó para calentar las muestras en dos carreras distintas. La primera ejecución se llevó a cabo desde la temperatura ambiente hasta 150 °C, a una relación de calentamiento de 10 °C/min, destinada a borrar la historia térmica del material. La segunda corrida se realizó a partir de 0 °C (enfriando con nitrógeno líquido) hasta 300 °C, con una relación de calentamiento de 10 °C/min. Se utilizó un soporte de muestra de aluminio sellado. El gas de flujo fue nitrógeno, a una velocidad de 50 ml/min. La masa de las muestras analizadas fue de  $13,6 \pm 1,2$  mg. La norma que se siguió para adquirir esta información fue la ASTM D7426-08 que describe el procedimiento para determinar la temperatura de transición de un polímero.

### 4.2.3 Estructura cristalina

Los patrones de difracción de rayos-X de la materia prima usada en esta investigación se obtuvieron con un difractómetro con radiación  $\text{CuK}\alpha$  (40 mA, 45 KV) y velocidad de barrido de 1.2°/min. Variando el ángulo  $2\theta$  desde 3° hasta 70° con área activa 2, tamaño del paso 0.0263 y en configuración Bragg Brentano.

## 4.3 Fabricación de los dispositivos

Se diseñó un sistema de fabricación aditiva por capas (ALM Additive Layer Manufacturing) comandado por el software Arduino y Cura; compuesto por un extrusor, una camisa y un pistón hechos en acero inoxidable, que se calentaban a la temperatura de fusión del polímero, y tenía una base con desplazamiento en los ejes X, Y y Z. La velocidad de desplazamiento del extrusor fue de 60 mm/s, el desplazamiento mínimo de la base fue de 0,2 mm y el tamaño de la boquilla fue de 0,2 mm. La presión de inyección para el desplazamiento del material a través de la boquilla fue de 5 MPa, la temperatura de la boquilla y de la base fue 160 °C y 50 °C respectivamente.

Se fabricaron 3 probetas simultáneamente en un tiempo total de 20 minutos, permitiendo que la capa dispensada se alcanzara a secar cuando se dispensara la siguiente; ya que si no se alcanzaba a secar la capa anterior la estructura reticulada no se formaba porque todo el material quedaba adherido a la boquilla del prototipo de ALM. La malla, líneas de impresión que forman las capas, fue la misma para todas las probetas y se tomó teniendo en cuenta el trabajo de Hutmacher, 2000 y Moroni, 2016. La geometría de la superficie de la malla fue similar a la de un panal de abejas, y el grosor de cada línea de impresión fue de 0,2 mm, igual a la que Chen y Ma, 2006 obtuvieron en su investigación utilizando otro método de fabricación.

Para esta investigación se seleccionaron dos tipos de geometrías para elaborar las probetas, tetragonal y cilíndrica, con el fin de observar las diferencias entre estructuras con ángulos cerrados y sin ángulos. Las dimensiones propuestas para la fabricación de las probetas se relacionan en la **Tabla 4-1**. Las dimensiones se seleccionaron intencionalmente, con la finalidad de conseguir geometrías y escalas similares a las de un implante comercializado y que permitieran la observación de cambios durante la experimentación.

**Tabla 4-1** Dimensiones calculadas de las probetas

<b>Probetas Tetragonales</b>	<b>Probetas Cilíndricas</b>
Altura: 3,0 mm	Altura: 3,0 mm
Lado a: 7,2 mm	Diámetro: 8,1 mm
Lado b: 7,2 mm	

#### **4.4 Caracterización de los dispositivos fabricados**

Una vez fabricados los dispositivos de prueba, se verificaron sus dimensiones y peso, y se realizó una evaluación microbiológica.

#### **4.4.1 Verificación de dimensiones**

Se midieron las dimensiones de las probetas antes de iniciar el ensayo de degradación; para el caso de las probetas cilíndricas, se midió 3 veces la altura y el diámetro para luego promediar cada dato. Para las probetas en forma tetragonal se tomaron las medidas de ancho, largo y alto 3 veces cada una, y cada dato se promedió. Lo anterior con una legibilidad de 0.001 mm.

#### **4.4.2 Verificación de peso promedio**

Antes de iniciar el ensayo de degradación cada dispositivo fabricado se pesó 3 veces, con una legibilidad de 0,1 µg. Se halló el promedio y la incertidumbre de las probetas tetragonales y cilíndricas por separado.

#### **4.4.3 Evaluación microbiológica de los dispositivos**

Se hizo un conteo microbiológico de las probetas elaboradas usando la técnica de la farmacopea UPS 39, método de siembra en placa por profundidad; con el fin de establecer la carga microbiológica inicial del dispositivo de prueba para el ensayo de degradación.

### **4.5 Montaje del ensayo de degradación**

A continuación se describen las condiciones en las que se realizó este ensayo.

#### **4.5.1 Preparación de medio simulado**

Se preparó un medio PBS0,1M, de acuerdo con la composición relacionada en la **Tabla 4-2**:

**Tabla 4-2** Preparación de PBS 0,1 M

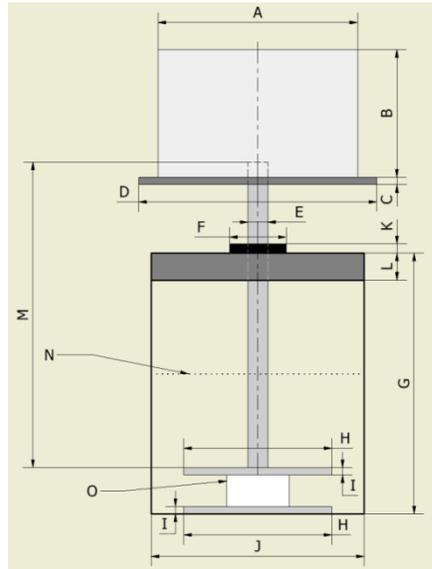
Reactivo	Cantidad g/L
NaCl	8,0
KCL	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4
NaN <sub>3</sub>	0,01

Se midió el pH, la temperatura y conductividad del medio y posteriormente se cambió semanalmente; durante el ensayo de degradación el medio se mantuvo a pH 7,4 ±0,2 y a temperaturas 37 ±1 °C y 50 ±1 °C. Se utilizó ázida sódica como agente conservante.

Para el ensayo de degradación se trabajó un volumen de 20 ml de medio PBS por cada probeta, teniendo en cuenta que la relación volumen del medio, en mililitros, con la masa de la probeta, en gramos, debía ser igual o mayor a 30 ml: 1 g y la muestra debía estar totalmente inmersa en la solución, según ISO 13781:1997 y ASTM 1635. De igual manera, en las normas consultadas se describe que todos los recipientes empleados en el ensayo deben ser de vidrio para evitar contaminación.

#### 4.5.2 Sistema de carga

Para transmitir una fuerza a compresión de 0, 10 y 20 N sobre las probetas de PLGA se diseñó el montaje de la **Figura 4-1**, el cual aseguró una carga constante durante el ensayo. Dicho montaje no requirió calibración al ser la masa de la carga la misma a lo largo del experimento; sin embargo, diariamente se verificaba que el sistema estuviera nivelado y transmitiera de forma homogénea la carga mecánica sobre la probeta.

**Figura 4-1** Esquema del montaje de degradación**Tabla 4-3** Cotas del esquema del montaje de degradación

Letra	Nombre	Medida (mm)
A	Diámetro de la carga	63,92
B	Altura de la carga	0/ 40,60/ 81,22
C	Altura de la base de la carga	2,4
D	Ancho de la base de la carga	76,16
E	Diámetro de la barra	6,3
F	Diámetro del sello de seguridad	18,15
G	Altura del recipiente	83,03
H	Ancho de la base de la probeta	47,2
I	Altura de la base de la probeta	2,4
J	Diámetro del recipiente	66,70
K	Altura del sello de seguridad	2
L	Altura de la tapa del recipiente	8,6
M	Altura de la barra	97,2
N	Nivel del medio	10

---

0	Probeta de PLGA	3,1
---	-----------------	-----

---

La estructura se hizo en acero inoxidable para evitar que el material que transfería la carga influyera en el proceso de degradación de la probeta. La masa que actuó como carga, estaba hecha en acero 10-20 y no tenía contacto con el medio ni con la probeta. La tapa tenía un sello de seguridad que evitaba que quedaran espacios por donde el medio se pudiera evaporar.

### 4.5.3 Temperatura de trabajo

Se ajustó un baño termostático a  $37 \pm 1$  °C para evaluar la degradación de las probetas en tiempo real, teniendo en cuenta que es la temperatura de trabajo del dispositivo *in vivo* y además es el valor reportado en la mayoría de las investigaciones para evaluar el comportamiento de dispositivos médicos implantables.

Para controlar la posible evaporación del medio, cada unidad experimental se selló con un empaque que evitó dicha evaporación (**Figura 4-1**), adicionalmente el baño termostático se cubrió con una película que evitaba su evaporación. Durante los cambios de medio que se llevaron a cabo semanalmente, las probetas no permanecieron por más de 5 min fuera del baño termostático, como lo establece la norma ISO 13781:1997.

Cada día se hacía seguimiento a la temperatura dos veces para garantizar el suministro de temperatura. El baño termostático estuvo conectado a una UPS durante todo el tiempo de experimentación.

### 4.5.4 Razones para terminar el ensayo

El ensayo a 37°C se termina cuando:

- Se cumple el tiempo pre-establecido.
- Cuando una probeta colapsa o se fractura considerablemente.
- Cuando se evidencia alguna contaminación en el medio.

- Cuando los valores de pH y temperatura se salen del rango establecido en la norma (pH  $7.4 \pm 0,2$  y temperatura  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

Por otro lado, el ensayo a  $50^{\circ}\text{C}$  se termina cuando:

- El polímero pierde más del 80% de masa.
- Cuando se evidencia alguna contaminación en el medio.
- Cuando el medio deja de estar a pH  $7.4 \pm 0,2$  y a temperatura de  $50 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

## 4.6 Cuantificación del polímero degradado

Se eligió el método de espectrofotometría UV-VIS, porque se buscó estudiar la degradación general del polímero y no la degradación particular de sus monómeros constituyentes, la cual ha sido suficientemente estudiada utilizando técnicas como HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia) (Dingy Schwendeman, 2004; Zamanova et al., 2014); además las propiedades de absorción del PLGA hacen que este polímero interactúe con la radiación UV y así la luz absorbida por este, permite cuantificar la cantidad de polímero que se ha degradado al medio. De igual manera se eligió este método porque ya se ha implementado en otras investigaciones como la de Ying y Shuli, 2001 y Li, 2009. Por último, la espectrofotometría UV-VIS es una técnica rápida y evita confusiones o errores al ser fácil de implementar.

Teniendo en cuenta lo anterior, se hizo necesario asegurar la calidad, precisión y selectividad de la variable que se midió validando la técnica, para así demostrar que los resultados fueron correctos y por ende que el método se ajustó a su propósito.

### 4.6.1 Validación del método de cuantificación

Para realizar la validación se preparó una solución de trabajo con 200 mg de PLGA en 100 mL de NaOH a 0,85 N. El polímero se puso en contacto con el hidróxido de sodio durante 5 días a  $50^{\circ}\text{C}$  en una placa agitadora a velocidad 3 con un agitador magnético hasta solubilizarse por completo; posteriormente esta solución se diluyó en PBS 0.1M de acuerdo con las

---

concentraciones de la **Tabla 5-9** para hacer 3 curvas con 7 puntos. La longitud de onda de trabajo para la cuantificación del polímero fue de 207nm, de acuerdo con la forma y longitud de onda de las gráficas espectrofotométricas UV-VIS reportadas por Oliveira et al., 2015.

Los parámetros para la validación del método son:

### **Especificidad:**

Este parámetro permite evaluar la capacidad del método para obtener una respuesta debida únicamente al PLGA degradado en el medio.

Esta variable se determinó analizando los espectrogramas del blanco, ácido láctico, ácido glicólico y del PLGA por separado. El PLGA en el medio se determina por la diferencia de absorbancia entre el espectrograma de PLGA y el blanco.

El criterio de aceptación consistió en demostrar que las lecturas realizadas se deben únicamente a la concentración de PLGA y no a la presencia de productos interferentes relacionados con el medio donde se realizó la degradación del PLGA.

### **Linealidad:**

Este parámetro de validación permite evaluar la capacidad que tiene el método de medir la absorbancia de una muestra de forma directamente proporcional a la concentración de PLGA en el medio, dentro del rango de linealidad de Beer Lambert (0,150-0,850).

Para la curva se trabajó con un rango de siete niveles de concentración de PLGA así 0,08, 0,16, 0,24, 0,32, 0,40, 0,48 y 0,52 mg/ml. Se realizaron tres réplicas por cada nivel de concentración, para un total de 21 determinaciones en cada una de las 3 curvas realizadas. Las muestras se analizaron realizando una lectura contra un blanco del solvente (PBS y NaOH).

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para la regresión y se usó el estadístico *t student* para evaluar la correlación, pendiente e intercepto con un grado de significancia  $\alpha = 0,05$ . El

criterio de aceptación es  $R^2 \geq 0,98$ , pendiente estadísticamente diferente de 0 e intercepto significativamente igual a 0.

### **Precisión intermedia:**

Este parámetro evalúa la concordancia entre las lecturas que se hicieron en tres días diferentes y repetidamente para formar los puntos de la curva de calibración en un mismo laboratorio. Esta información también es una medida del grado de reproducibilidad y repetibilidad de la curva.

Se prepararon 3 soluciones de PLGA en siete niveles de concentración de 0,08, 0,16, 0,24, 0,32, 0,40, 0,48 y 0,52 mg/mL en tres días diferentes.

El criterio de aceptación fue el coeficiente de variación de los resultados, el cual debía ser menor a 6% en el nivel inferior de concentración y para nivel medio y alto un coeficiente de variación menor al 3%. Además, se realiza la evaluación por medio de una ANOVA. El análisis de varianza (ANOVA) debe mostrar que los valores de  $F_{exp}$  (experimentales) son menores a  $F_{tab}$  (tabulados); indicando que los resultados de absorbancia no presentan una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de concentración con diferentes réplicas cuando el ensayo es realizado en días diferentes.

### **Exactitud**

Expresa la concordancia obtenida entre el valor de referencia y el valor obtenido empleando el método de cuantificación.

Este parámetro se evaluó comparando los niveles de concentración teóricos 0,24, 0,32 y 0,40 mg/mL con los valores de absorbancia leídos e interpolados en la curva de calibración (concentraciones adquiridas) para las muestras preparadas con las concentraciones teóricas anteriormente mencionadas.

Se realizó una ANOVA para el promedio del porcentaje de exactitud para la concentración del PLGA en los tres niveles del rango empleado, El criterio de aceptación fue el valor F

experimental, el cual debe ser menor que el F Crítico, indicando que los valores adquiridos son significativamente iguales al valor teórico.

### **Robustez:**

Es la capacidad del método para no afectar las mediciones con cambios pequeños pero deliberados en las variables normales del procedimiento. Las variables evaluadas fueron temperatura de lectura (20 y 37 °C), tiempo de lectura (0 y 1 h), longitud de onda a la cual se realizó la lectura (205 y 207 nm), marca del material de vidrio volumétrico (A y B), concentración del analito (0,16 mg/ml y 0,24 mg/ml) y pH (6,85 y 8,19).

Los datos obtenidos se evaluaron por medio de un análisis de varianza y el criterio de evaluación fue el valor P, el cual fue menor a 0,05 (nivel de significancia) en los casos en los que la alternancia en las variables no afectaba las mediciones.

## **4.7 Estudio de la cinética de degradación en tiempo real**

Con el fin de evaluar la degradación de los dispositivos de prueba se hizo seguimiento del cambio en el peso, volumen, porosidad de las probetas y del polímero liberado al medio (PBS 0,1 M) teniendo en cuenta la metodología que se presenta en esta sección.

Las probetas se pesaron y midieron al iniciar el experimento (Secciones 4.4.1 y 4.4.2), se sumergieron 10 minutos en agua destilada, se sacaron las burbujas con una jeringa y luego se ingresaron al sistema de carga (**Figura 4-1**) donde fueron sumergidas en 20 ml de PBS 0,1 M durante los tiempos asignados en el diseño estadístico de experimentos (Sección 4.7.6), luego fueron sacadas del medio, lavadas con agua destilada y depositadas sobre papel absorbente a temperatura ambiente y se secaron usando el horno de vacío durante 48 horas a 25 °C.

### 4.7.1 Cambio en el peso de las probetas

Una vez se retiraba el agua de la probeta, ya fuera tetragonal o cilíndrica, se volvía a pesar 3 veces con una legibilidad de 0,1  $\mu\text{g}$  y de nuevo se hallaba el promedio y la incertidumbre, este dato es la masa final de la probeta ( $M$ ) y el dato obtenido en la sección 4.4.2 es la masa inicial ( $M_0$ ). Estos dos datos se reemplazaron en la ecuación 6 para hallar el porcentaje de masa que perdió la probeta a lo largo del ensayo.

$$\% \text{ Masa perdida} = \frac{M_0 - M}{M_0} * 100\% \quad (6)$$

### 4.7.2 Cambio en el volumen de las probetas

Una vez que la probeta se encontraba seca, sus dimensiones se volvían a medir 3 veces y de nuevo se hallaba el promedio y la incertidumbre. Para el caso de las probetas tetragonales se midió el lado A, lado B y la altura, y en las cilíndricas la altura y diámetro; en ambos casos se halló el volumen. Este dato es el volumen final de la probeta ( $V$ ) y el dato obtenido en la sección 3.4.1 es el volumen inicial ( $V_0$ ). Estos dos datos se reemplazaron en la ecuación 7 para hallar el porcentaje de variación del volumen en la probeta durante el ensayo.

$$\% \text{ de cambio de Volumen} = \frac{V_0 - V}{V_0} * 100\% \quad (7)$$

### 4.7.3 Cambio en la porosidad de las probetas

Para hallar la porosidad de los dispositivos fabricados ( $P_o$ ), entendida como la relación de espacios vacíos versus espacios ocupados con materia prima en cada probeta, y su cambio durante el tiempo de experimentación, se halló la densidad inicial de las probetas tomando la masa de cada probeta y dividiéndola por su respectivo volumen inicial. Dicha densidad ( $\delta_R$ ) se reemplazó en la ecuación 8, la densidad aparente ( $\delta_A$ ) del PLGA es 1,2825  $\text{g}/\text{cm}^3$ .

$$\text{Porosidad} = \frac{(\delta_R - \delta_A)}{\delta_R} * 100 \quad (8)$$

Para hallar la porosidad de los dispositivos ( $P$ ) al finalizar su respectivo tiempo de degradación se siguió el procedimiento anterior usando los valores de volumen y peso después de ser retiradas las probetas del montaje de experimentación.

Finalmente se halló el porcentaje de variación de la porosidad de las probetas con la ecuación 9:

$$\% \text{ de cambio de la porosidad} = \frac{P_o - P}{P_o} * 100 \quad (9)$$

#### 4.7.4 Polímero liberado al medio

Se tomaron 3 muestras de 3 ml del medio PBS 0,1M de cada unidad experimental semanalmente y se leyeron en el espectrofotómetro referenciado en la sección 4.1, este valor se promedió y se extrapola a la curva de calibración de la sección 3.6. El valor que se halló en la curva de calibración se multiplicó por la cantidad de medio de cada unidad experimental, este valor es la concentración liberada al final del tiempo de degradación.

#### 4.7.5 Balance de masas

El proceso de degradación al cual están sujetas las probetas, debe cumplir la ley de la conservación de la masa (ecuación 10), es decir, la masa inicial ( $M_o$ ) de cada probeta debe ser igual a la masa de la probeta en cada punto de la observación después de ser secadas ( $M$ ) junto con la cantidad de polímero liberado al medio en cada punto de la observación ( $M_L$ , sección 4.7.4), es decir la masa al final de la degradación  $M_d$ . El porcentaje de diferencia entre los dos valores (Ecuación 11) anteriormente mencionados debe ser cercano a 0.

$$M_d = M_o - M_L \quad (10)$$

$$\% \text{ de diferencia} = \frac{M_o - M_d}{M_o} * 100 \quad (11)$$

### 4.7.6 Diseño Experimental

El diseño experimental usado en este trabajo de investigación es de bloques balanceados, el cual consta de tres factores carga, geometría y tiempo; la carga tiene tres niveles 0 N, 10 N y 20 N, la geometría tiene dos niveles tetragonal y cilíndrica, y la duración del ensayo fue de 10 semanas tomando muestras cada dos semanas. El bloque es la geometría ya que su asignación no fue aleatoria.

Se disponen los datos en una tabla ordenada con columnas niveles del factor CARGA, y filas niveles del factor TIEMPO, por tanto las celdas corresponden a los tratamientos, y en estas se colocarán las observaciones. Las variables de respuesta son masa perdida, cambio de volumen, cambio de porosidad y polímero liberado al medio; los datos se toman de las secciones 4.7.1, 4.7.2, 4.7.3, y 4.7.4 respectivamente.

Así se tiene un conjunto de vectores aleatorios  $p$ -dimensionales e independientes que relacionara la respuesta (Ecuación 12):

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \theta_l + \gamma_{ijk} + \epsilon_{ijkl} \quad (12)$$

$$i = 1, \dots, f; j = 1, \dots, c; k = 1, \dots, n_{ij}, l = 1, \dots, t$$

Donde:

$\alpha_i$  efecto debido al  $i$ -ésimo nivel del factor CARGA,  $\beta_j$  efecto debido al  $j$ -ésimo nivel del factor TIEMPO,  $\theta_l$  efecto debido de bloque,  $\gamma_{ijk}$  efecto debido a la interacción entre el  $i$ -ésimo nivel del factor CARGA y el  $j$ -ésimo nivel del factor GEOMETRIA.

Para analizar la información obtenida se hizo un análisis multivariado de varianza (MANOVA), usando el software estadístico R. Se tomaron 5 variables de respuesta (densidad, volumen, masa perdida, concentración y porosidad) para los datos tomados en las 10 semanas de experimentación; este análisis presenta significancia para los factores estudiados y la respuesta media de los tratamientos por medio de la traza de Bartlett-Nanda-Pillai (Ecuación 13).

$$V = tr (H(E + H)^{-1}) \quad (13)$$

Donde  $H$ , representa la suma de cuadrados para cada factor, y  $E$  representa la suma de cuadrados del error.

Para encontrar qué niveles de la carga mecánica tienen mayor efecto sobre las variables respuesta se implementa el método de Tukey, que evalúa si la diferencia en los efectos medios de los niveles es igual a cero. Esto lo hace protegiendo el alza en la probabilidad de cometer error tipo I (Rechazar la hipótesis nula, dado que esta es verdadera) resultante de las comparaciones múltiples; sin embargo, al tener 5 variables respuesta, si se tomara como valor de significancia  $\alpha = 0,05$ , la probabilidad real sería la que se presenta en la ecuación 14:

$$a_c = 1 - (1 - \alpha)^{\frac{5(5-1)}{2}} \quad (14)$$

$$= 0,4012$$

Por lo cual se realiza la corrección apropiada y resulta en una significancia de las pruebas  $a_c = 0,00511$  para obtener un nivel global del 5 %. Los intervalos que permiten visualizar las pruebas para cada variable de respuesta se construirán con una confianza del  $(1 - a_c)$  por la misma razón.

A continuación, se muestra cómo se organizó el montaje y toma de muestra durante el ensayo, teniendo en cuenta el diseño de bloques balanceados propuesto en la **Tabla 4-4**:

**Tabla 4-4** Montaje del experimento

Réplica	Semana	Geometría	Tratamiento
1	2	Cilíndrica	Semana 2 Cilíndrica 10 N
2		Tetragonal	Semana 2 Tetragonal 0 N
3		Cilíndrica	Semana 2 Cilíndrica 20 N
4		Tetragonal	Semana 2 Tetragonal 10 N
5		Cilíndrica	Semana 2 Cilíndrica 0 N
6		Tetragonal	Semana 2 Tetragonal 20 N
7	4	Cilíndrica	Semana 4 Cilíndrica 10 N
8		Tetragonal	Semana 4 Tetragonal 0 N

9		Cilíndrica	Semana 4 Cilíndrica 20 N
10		Tetragonal	Semana 4 Tetragonal 10 N
11		Cilíndrica	Semana 4 Cilíndrica 0 N
12		Tetragonal	Semana 4 Tetragonal 20 N
13		Cilíndrica	Semana 6 Cilíndrica 10 N
14		Tetragonal	Semana 6 Tetragonal 0 N
15	6	Cilíndrica	Semana 6 Cilíndrica 20 N
16		Tetragonal	Semana 6 Tetragonal 10 N
17		Cilíndrica	Semana 6 Cilíndrica 0 N
18		Tetragonal	Semana 6 Tetragonal 20 N
19		Cilíndrica	Semana 8 Cilíndrica 10 N
20		Tetragonal	Semana 8 Tetragonal 0 N
21	8	Cilíndrica	Semana 8 Cilíndrica 20 N
22		Tetragonal	Semana 8 Tetragonal 10 N
23		Cilíndrica	Semana 8 Cilíndrica 0 N
24		Tetragonal	Semana 8 Tetragonal 20 N
25		Cilíndrica	Semana 10 Cilíndrica 10 N
26		Tetragonal	Semana 10 Tetragonal 0 N
27	10	Cilíndrica	Semana 10 Cilíndrica 20 N
28		Cilíndrica	Semana 10 Tetragonal 10 N
29		Tetragonal	Semana 10 Cilíndrica 0 N
30		Cilíndrica	Semana 10 Tetragonal 20 N

#### 4.7.7 Comportamiento térmico

Se siguió la metodología de la sección 4.2.2 para una probeta de la semana 3, 4, 9 y 10 del experimento.

#### **4.7.8 Comportamiento cristalino**

Se siguió la metodología de la sección 4.2.3 para una probeta de la semana 5, 7 y 10 del experimento. Se tomó la probeta completa después de extraer el PBS con el horno de secado.

#### **4.7.9 Cambios micro estructurales**

Para el análisis de la morfología microscópica interna de las probetas se utilizó un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 con un vacío de  $5.5 \times 10^{-3}$  Pa a 30 kV, las muestras se fracturaron con nitrógeno líquido y las partes internas se recubrieron con Au a 80 mA por 60 s en una atmosfera de Ar con el equipo Quorum 150R. Con estas imágenes se buscó ver la erosión de la muestra, posibles alineaciones de las “fibras” de la probeta, estructuras cristalinas o frentes de degradación.

#### **4.7.10 Cambios macro estructurales**

Para este tipo de análisis se usó un estéreo microscopio y se tomaron fotografías para determinar cómo se presenta el fenómeno de erosión en la probeta, y cómo el medio ingreso en esta.

#### **4.7.11 Cinética de degradación a 37 °C**

Se toman los datos obtenidos en la sección 4.7.4 y se organizan de acuerdo con cada tratamiento: tetragonal a 0N, tetragonal a 10N, tetragonal a 20N, cilíndrica a 0N, cilíndrica a 10N y cilíndrica a 20N.

La tasa de disminución de la concentración (C) de las probetas en el tiempo se determina mediante la ecuación 15:

$$\frac{dc}{dt} = -k C^n \quad (15)$$

$n$  es el orden de la cinética, para cinéticas de primer orden es 1,

$$\frac{dc}{c} = -k dt \quad (16)$$

La anterior ecuación se integra quedando la ecuación 17:

$$\ln C = -kt + A \quad (17)$$

En la ecuación 17, se despeja la concentración (C) y se obtiene:

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt \quad (18)$$

Se grafican los datos obtenidos para cada tratamiento, teniendo en cuenta la ecuación 18, y se hace una regresión lineal para determinar el valor de  $k$  y su coeficiente de correlación.

#### **4.7.12 Ajuste al modelo de Hopfenberg**

Se trabaja con el modelo de cinética de degradación propuesto por Hopfenberg teniendo en cuenta que el mecanismo de degradación del PLGA durante la investigación se dio por erosión y porque este modelo tiene una variable exclusiva para la geometría de la probeta, de igual manera los datos obtenidos en la sección 4.7.4 se ajustaron a este modelo de acuerdo con la suma de cuadros de cada curva.

### **4.8 Estudio de la cinética de degradación en condiciones aceleradas**

Se realizó un ensayo acelerado a  $50 \pm 1$  °C por 25 días para evaluar la cinética de degradación del material sin procesar (materia prima), material manufacturado con carga a compresión de

20 N y sin carga. Se trabajó con las mismas condiciones de la sección 4.5, las lecturas se realizaron cada 24 horas y en el mismo intervalo de tiempo el medio se cambió. Las masas iniciales se presentan en la **Tabla 4-5**:

**Tabla 4-5** Probetas usadas para el ensayo acelerado

No	Característica	Peso (mg)
1	Materia prima	146,03 ± 0,04
2	Probeta cilíndrica	169,38 ± 0,02
3	Probeta tetragonal	137,69 ± 0,01
4	Probeta cilíndrica 20N	127,47 ± 0,04
5	Probeta tetragonal 20N	147,33 ± 0,04

#### 4.8.1 Polímero liberado al medio

Se siguió el procedimiento de la sección 4.7.4.

#### 4.8.2 Cinética de degradación a 50 °C

Se tomaron los datos obtenidos en la sección 4.8.1 y se organizaron de acuerdo con cada tratamiento: materia prima, tetragonal a 0N, tetragonal a 20N, cilíndrica a 0N y cilíndrica a 20N. Luego los datos se ajustaron a las ecuaciones de la sección 4.7.12 y se determinó el orden de la cinética.

#### 4.8.3 Ajuste al modelo de Hopfenberg

Los datos obtenidos en la sección 4.8.1 se ajustan a la ecuación de Hopfenberg (Sección 2.6) y el grado de ajuste se determina con la suma de cuadros de cada curva.

## 4.9 Efecto de la temperatura en la velocidad de degradación

Para determinar el efecto de la temperatura en la velocidad de degradación de los dispositivos de prueba se tomaron las constantes de velocidad halladas de las secciones 4.7.12 y 4.8.2 y se graficaron teniendo en cuenta la ecuación de Arrhenius (19) cuya pendiente es la energía de activación del proceso.

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{2,303 RT} \quad (19)$$

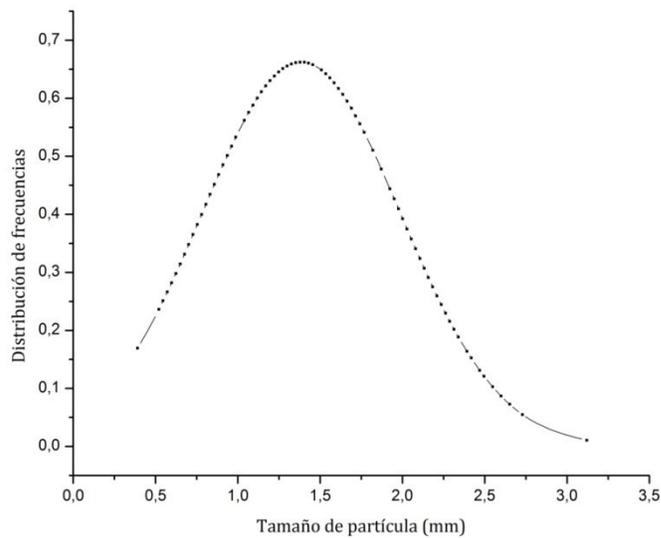
## 5. Resultados y Discusión

### 5.1 Caracterización de la materia prima

#### 5.1.1 Tamaño promedio de los pellets

La materia prima presentó forma irregular por tratarse de pellets molidos. De acuerdo con la observación el tamaño promedio de partícula estuvo entre 0,782 y 1,987 mm (Ver **Figura 5-1**).

**Figura 5-1** Distribución del tamaño de partícula de la materia prima



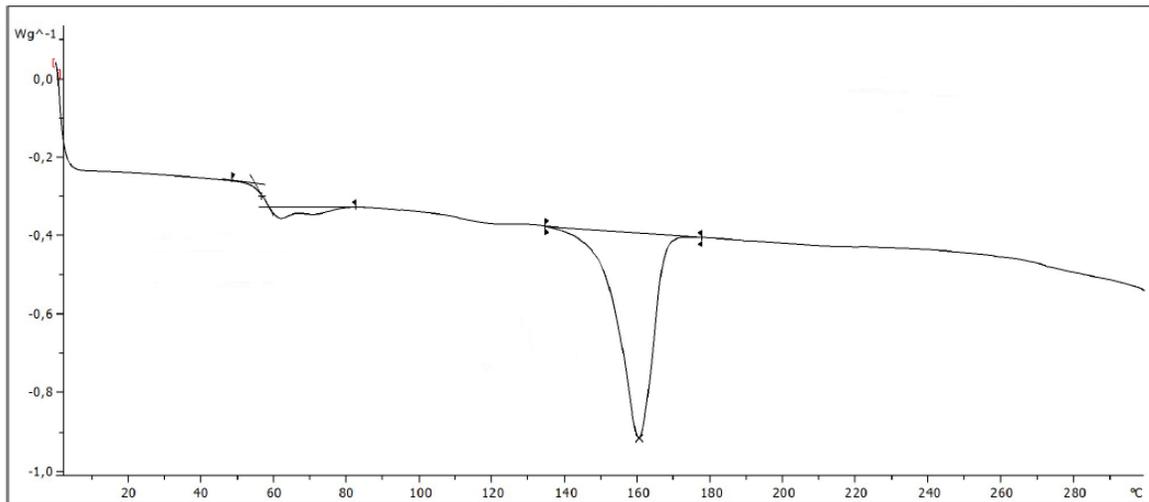
Este tamaño de partícula y su desviación facilitaron la manufactura de las probetas al poder empaquetar mejor la materia prima dentro de la camisa del extrusor del prototipo de ALM, es decir, quedaron menos espacios vacíos, lo que permitió que la cantidad de polímero que fluía por la boquilla fuera más homogénea que si se hubieran usado pellets de tamaño y forma regular.

### 5.1.2 Comportamiento térmico

Se encontró que el PLGA 82:18 usado en este trabajo corresponde a un polímero semicristalino; presentó una transición vítrea, evento cinético con temperatura de inflexión de 57,7 °C y una fusión, evento termodinámico con un pico endotérmico a 161 °C (**Figura 5-2**).

Los valores numéricos se presentan en la sección 5.5.3 para facilitar la comparación de resultados.

**Figura 5-2** Termograma de PLGA en pellets sin procesar



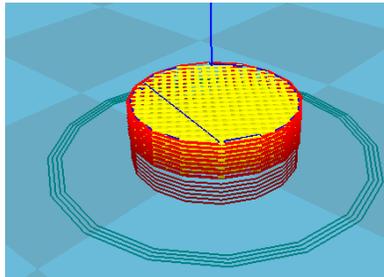
A partir del termograma de la **Figura 5-2** se determinó la temperatura de trabajo del prototipo de ALM y se comparó el comportamiento del material con lo reportado en la bibliografía. Se encontró que el segmento de transición vítrea estaba dentro de los rangos reportados, 40 a

60 °C, (Välímää y Laaksovirta, 2003; Park y Kang, 2013; Corrian y Li, 2013; Coelho et al., 2015). Sin embargo, Coelho et al., 2015 menciona que el PLGA 82:18 es un polímero amorfo debido a que los polímeros constituyentes del PLGA son D, L-láctico y glicólico, por lo cual no presenta temperatura de fusión. La temperatura de fusión que se observó en la materia prima usada en esta investigación se debe a que esta está compuesta por L-láctico y glicólico como polímeros constituyentes, por esto es semicristalino y sus tiempos de degradación y resistencia mecánica aumentan en comparación con el PLGA amorfo.

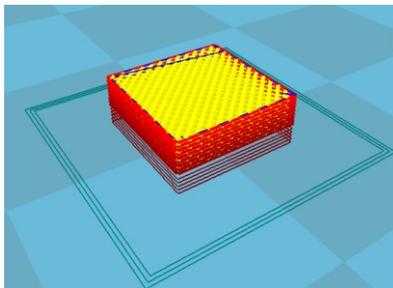
## 5.2 Caracterización de los dispositivos fabricados

A continuación, se presenta el esquema de los dispositivos fabricados, los cuales mostraron una porosidad del  $35 \pm 10\%$  (Este valor se halló tomando la relación de espacios vacíos y con polímero de cada probeta):

**Figura 5-3** Diseño probeta cilíndrica



**Figura 5-4** Diseño probeta tetragonal



La estructura fabricada garantiza inter-conectividad entre los espacios vacíos aunque no replica a cabalidad la matriz extracelular del hueso debido a que el método de fabricación no alcanza las porosidades típicas para esta clase de estructuras, entre 90 al 95% con tamaño de poro entre 100 y 500  $\mu\text{m}$  (Puppi, 2010, Felfel 2012, Sultana 2013); sin embargo varios autores han reportado adhesión y crecimiento celular usando este tipo de estructura reticulada; por ejemplo Moroni, Hendriks, Schotel, et al., 2006 fabricaron scaffolds con una malla muy similar a las obtenidas en este trabajo (**Figura 5-3** y **Figura 5-4**), sembraron condrocitos articulares primarios bovinos y los cultivaron durante 21 días; observaron formación de GAG específicos para cartílago y las células se organizaron en lagunas rodeadas por una matriz extracelular, lo cual es típico para la organización del cartílago.

### 5.2.1 Verificación de dimensiones

Las dimensiones de cada probeta fabricada se relacionan en la **Tabla 5-1** y **Tabla 5-2**. Cabe resaltar que todas las probetas estuvieron sujetas al mismo protocolo de fabricación y cada dimensión se midió 3 veces.

**Tabla 5-1** Dimensiones reales de las probetas cilíndricas

# de probeta en el ensayo	Diámetro Promedio (mm)	Altura (mm)
1	8,108	3,194
3	8,267	3,299
5	8,045	3,054
7	8,245	3,252
9	8,133	3,186
11	8,020	3,166
13	8,177	2,975
21	8,008	3,181
17	8,040	3,315
19	8,268	3,355

<b>15</b>	8,063	3,348
<b>23</b>	8,177	2,991
<b>25</b>	8,167	3,235
<b>27</b>	8,068	3,130
<b>29</b>	8,057	3,230
Exactitud	0,023	0,194
Precisión	0,090	0,118
Incertidumbre	0,056	0,056

**Tabla 5-2** Dimensiones reales de las probetas tetragonales

# de probeta en el ensayo	Lado A (mm)	Lado B (mm)	Altura (mm)
<b>2</b>	7,337	7,106	3,185
<b>4</b>	7,090	7,044	3,501
<b>6</b>	7,358	7,201	3,140
<b>8</b>	7,457	7,188	3,009
<b>10</b>	7,390	7,213	3,332
<b>12</b>	7,357	7,247	3,277
<b>14</b>	7,214	7,140	3,334
<b>16</b>	7,310	7,223	3,196
<b>18</b>	7,151	7,193	3,373
<b>20</b>	7,210	7,196	3,171
<b>22</b>	7,183	6,996	3,355
<b>24</b>	7,357	7,258	3,037
<b>26</b>	7,354	7,219	3,264
<b>28</b>	7,351	7,244	2,904
<b>30</b>	7,294	7,216	3,198
Exactitud	0,094	0,021	0,218
Precisión	0,102	0,076	0,156
Incertidumbre	0,056	0,056	0,056

El método de fabricación permitió obtener probetas exactas ya que los valores medidos se acercaron considerablemente al valor propuesto en la metodología, sin embargo, las dimensiones de las probetas no fueron muy precisas porque las medidas hechas mostraron dispersión. Esto pudo ser causado por las variaciones que se presentaban cuando el prototipo de ALM regulaba la temperatura de fusión del polímero. Estos defectos en la estructura del implante asociados al método de fabricación pueden desmejorar o comprometer las propiedades mecánicas del dispositivo de prueba.

### 5.2.2 Verificación de peso promedio

**Tabla 5-3** Masa de las probetas fabricadas

Probetas cilíndricas	Masa (mg)	Probetas tetragonales	Masa (mg)
<b>1</b>	171,51	<b>2</b>	172,93
<b>3</b>	174,54	<b>4</b>	173,74
<b>5</b>	181,98	<b>6</b>	177,62
<b>7</b>	174,77	<b>8</b>	168,96
<b>9</b>	180,79	<b>10</b>	173,8
<b>11</b>	176,55	<b>12</b>	172,47
<b>13</b>	181,3	<b>14</b>	185
<b>21</b>	184,75	<b>16</b>	185,55
<b>17</b>	170,9	<b>18</b>	181,52
<b>19</b>	177,88	<b>20</b>	188,67
<b>15</b>	173,67	<b>22</b>	183,88
<b>23</b>	181,35	<b>24</b>	179,99
<b>25</b>	183,19	<b>26</b>	174,11
<b>27</b>	178,82	<b>28</b>	179,5
<b>29</b>	180,71	<b>30</b>	173,93
Exactitud	0,18	Exactitud	0,11
Precisión	4,32	Precisión	5,84
Incertidumbre	0,18	Incertidumbre	0,18

Se encontró que la regulación de la temperatura del prototipo de ALM afectó más el peso inicial de las probetas que sus dimensiones, ya que dispensó más materia prima en algunas secciones que en otras, conservando en términos generales las dimensiones de las probetas. Estas

variaciones no afectan los resultados posteriores debido a que todos los datos se normalizaron con respecto al peso inicial para anular estas diferencias.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que la presencia de defectos en la estructura del implante asociados al método de fabricación puede desmejorar o comprometer las propiedades mecánicas del dispositivo. Por esto la manufactura aditiva por capas y sus procesos de fabricación tienen un reto importante al tener que mejorar la precisión y reproducibilidad de los dispositivos fabricados a partir de materias primas que no son reproducibles en sus porcentajes de monómeros, peso ni distribución molecular, y por tanto en su comportamiento reológico. Esta variabilidad en la materia prima dificulta la estandarización de la fabricación.

### 5.2.3 Conteo microbiológico

En el conteo microbiológico se halló lo siguiente en la probeta:

**Tabla 5-4** Conteo microbiológico

<b>Microorganismo</b>	<b>Resultado</b>
Mesófilos aerobios	<10 UFC/g
Mohos y Levaduras	<10 UFC/g
Coliformes totales	Ausentes

**Tabla 5-5** Control negativo de medios de cultivo

<b>Control Negativo de Medios de Cultivo</b>	
Agar Eosina Azul de Metileno Lote: 213647	Crecimiento Negativo
Agar Sabouraud Lote: 105386	Crecimiento Negativo
Agar Tripiticasa Soya Lote: 248163	Crecimiento Negativo

El contenido inicial de microorganismos permite establecer que los eventos de la degradación en este trabajo no estarán asociados a la presencia de microorganismos en las probetas de partida. Este efecto también se controló durante el ensayo mediante el uso de ázida sódica garantizando que la degradación durante el experimento solo estuviera influenciada por el medio, la temperatura y el efecto de la carga mecánica a compresión.

### **5.3 Seguimiento de las variables del montaje de degradación**

Se eligió el PBS 0,1 M como medio de degradación, porque su osmolaridad y concentración de iones es muy similar al líquido extracelular en los mamíferos y se ha empleado con frecuencia en las investigaciones reportadas en el estado del conocimiento (Lu et al., 2000; Fan et al., 2008; Vey et al., 2011; Lin, et al., 2013; Felfel, 2014; Teodora et al., 2015). De igual manera las normas ISO 13781:1997, ASTM F1635-11 y ASTM F2502 recomiendan su uso para evaluar la degradación *in vitro* de polímeros y formas fabricadas para implantes quirúrgicos.

La temperatura del ensayo en cada caso fue  $37 \pm 1$  °C y  $50 \pm 1$  °C, el pH fue  $7,4 \pm 0,2$  y la conductividad estuvo en  $120 \pm 60$  mS/cm durante todo el ensayo. Referente a la temperatura de operación, esta se midió con un termómetro de mercurio 3 veces al día a pesar de que el baño termostático tenía su propio sistema de medición y control de temperatura.

El pH del sistema no cambió durante el experimento debido a la capacidad amortiguadora del medio utilizado; sin embargo, esto no implica que *in vivo* el pH se mantenga constante en relación a la cantidad de polímero liberado, por tal motivo se debe evaluar el tamaño de los implantes usados en zonas poco vascularizadas (Farah, Anderson y Langer, 2016) o evaluar el efecto de la concentración de polímero liberado que puede admitir la zona de implantación y la frecuencia con la que dicha zona metaboliza los productos de degradación.

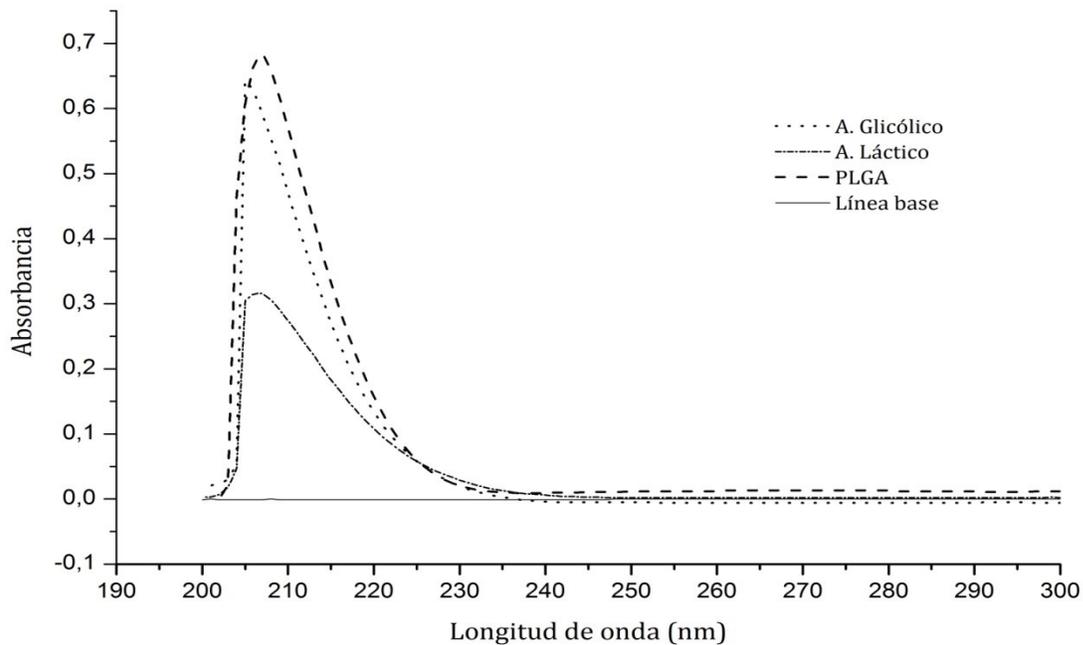
## 5.4 Resultados de la validación de la técnica por espectrofotometría

El método cuantifica polímero liberado al medio entendido esto como unidades de ácido láctico y glicólico.

- **Especificidad**

Los espectros de absorción del ácido láctico, ácido glicólico y del PLGA son parecidos, y reportan su máxima absorbancia a 207 nm. Se determina que el medio de degradación (PBS) y el solvente (NaOH) no afectan las lecturas de PLGA porque son el blanco para la lectura y por tanto forman la línea base.

**Figura 5-5** Espectros de absorción

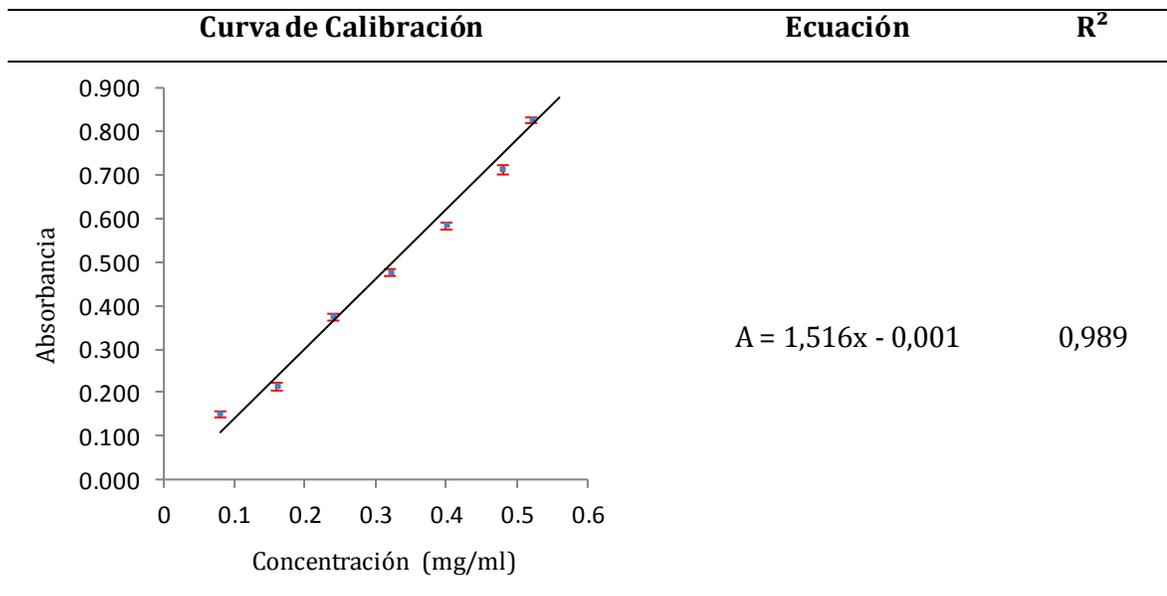


Se observa que la señal usada en la determinación corresponde únicamente a unidades de láctico y glicólico en las condiciones fijadas de experimentación y realizando la lectura a 207 nm.

- **Linealidad**

A continuación se muestra la curva de calibración obtenida (Ver anexo 1):

**Tabla 5-6** Curvas de calibración por espectrofotometría



**Tabla 5-7** ANOVA para la linealidad

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0,550	0,550	368,963	1,2881E-06
Residuos	6	0,008	0,001		
Total	7	0,559			

**Tabla 5-8** Prueba *t Student* para la linealidad

Parámetro	Hipótesis nula	<i>t</i> observado	<i>t</i> tabulado	Concepto
Intercepto (a)	$H_o: \alpha = 0$	-0,620	2,447	Se acepta la hipótesis nula
Pendiente (b)	$H_o: \beta = 0$	19,208	2,447	Se rechaza la hipótesis nula
Correlación (r)	$H_o: r = 0$	18,133	2,447	Se rechaza la hipótesis nula

De acuerdo con la información de la tabla **Tabla 5-8** se concluye que el intercepto es significativamente igual a cero y la pendiente es significativamente diferente de cero al igual que la correlación, lo anterior indica que no hay dispersión estadísticamente significativa entre los resultados de las réplicas de las distintas concentraciones, corroborando el cumplimiento de la linealidad de la curva de calibración.

- **Precisión intermedia**

**Tabla 5-9** Coeficiente de variación de las curvas de calibración

Concentración (mg/ml)	Curva A CV (%)	Curva B CV (%)	Curva C CV (%)
0,08	4,662	6,038	0,491
0,16	4,233	4,458	3,133
0,24	2,088	1,262	2,758
0,32	1,683	0,823	1,228
0,40	1,386	1,524	1,259
0,48	1,500	1,184	1,016
0,52	0,778	1,260	1,126

Los coeficientes de variación para las concentraciones inferiores fueron menores al 6%, excepto para la curva B en 0,08 mg/ml; esto se debe a que los extremos de las curvas y en especial los de menor concentración pueden presentar mayor variabilidad al ser más difícil adquirir los volúmenes reales de las alícuotas. En cuanto a los niveles de concentración medios y superiores de la curva de calibración se encuentra que los coeficientes de variación son menores al 3% cumpliendo el criterio de aceptación. Teniendo en cuenta lo anterior los resultados de este parámetro de validación son aceptables para los propósitos de esta investigación.

A continuación se presenta el análisis de varianza para las curvas realizadas en tres días diferentes.

**Tabla 5-10** ANOVA de las curvas de calibración

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre curvas	0,002	2	0,001	0,015	0,984	3,466
Dentro de las curvas	1,615	21	0,076			
Total	1,617	23				

Se observa que el valor experimental de F es menor que su valor crítico, por tanto, no existen diferencias entre las tres curvas de calibración, ya que arrojan la misma absorbancia a iguales concentraciones indicando que la curva de calibración es repetible.

- **Exactitud**

Se presentan los resultados obtenidos del porcentaje de exactitud para las 3 concentraciones trabajadas.

**Tabla 5-11** Porcentaje de exactitud entre las concentraciones teóricas y adquiridas

Valor Teórico	Valor Adquirido Promedio	Calculado 1 (%)	Calculado 2 (%)	Calculado 3 (%)
0,24	0,25	100,319	103,892	104,167
0,32	0,31	96,677	98,120	99,975
0,40	0,38	94,657	96,966	96,966

Teniendo en cuenta la **Tabla 5-11** se hace el respectivo análisis de varianza (**Tabla 5-12**).

**Tabla 5-12** Anova para la exactitud

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	16,397	2	8,198	0,701	0,532	5,143
Dentro de los grupos	70,165	6	11,694			
Total	86,562	8				

Se observa que el valor F experimental es menor que el valor F crítico, se concluye que los promedios de exactitud obtenidos en cada réplica son iguales dentro de cada concentración y los resultados de porcentaje de exactitud para las 3 concentraciones también son iguales entre sí.

- **Robustez**

De acuerdo con la **Tabla 5-13** se concluye que la variable “marca del material de vidrio volumétrico” y la interacción entre las variables pH, concentración y tiempo de lectura no influyen en la medición del analito.

**Tabla 5-13** Parámetros de variación en la curva de calibración

Factores a Evaluar	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor F	Pr(>F)	
pH	1	0,0155	0,0155	85,675	1,45e-10	***
Concentración	1	19,092	19,092	10542,08	< 2e-16	***
Longitud de onda ( $\lambda$ )	1	0,0344	0,0344	189,949	5,25e-15	***
Tiempo	1	0,0015	0,0015	8,201	0,00733	**
Temperatura	1	0,3096	0,3096	1709,539	< 2e-16	***
Material de vidrio	1	0,0002	0,0002	1,317	0,25963	
pH:Concentración	1	0,0251	0,0251	138,434	3,68e-13	***
pH: ( $\lambda$ )	1	0,0079	0,0079	43,793	1,84e-07	***
Concentración: ( $\lambda$ )	1	0,0016	0,0016	8,700	0,00590	**
pH:Tiempo	1	0,0042	0,0042	22,985	3,61e-05	***
Concentración:Tiempo	1	0,0110	0,0110	60,465	7,22e-09	***
( $\lambda$ ):Tiempo	1	0,0029	0,0029	15,834	0,00037	***
pH:Temperatura	1	0,0166	0,0166	91,735	6,44e-11	***
pH:Concentración:( $\lambda$ )	1	0,0055	0,0055	30,510	4,33e-06	***
pH:Concentración:Tiempo	1	0,0000	0,0000	0,001	0,97453	
Residuales	32	0,0058	0,0002			

La mayor causa de variación para este parámetro de validación fue la concentración del analito debido a que se trabajó con dos concentraciones diferentes. La segunda causa de variación fue la temperatura de medición, razón por la cual se determinó realizar todas las lecturas a temperatura ambiente ( $19 \pm 1$  °C) teniendo en cuenta que este valor sirve como punto de referencia para comparar las lecturas de los ensayos de degradación a 37 y 50 °C; y porque a mayor temperatura, la degradación del polímero se acelera y por tanto se va a presentar mayor variación en las lecturas realizadas.

La tercera causa de variación fue la longitud de onda ( $\lambda$ ) de la lectura. Se determinó leer a 207 nm porque las lecturas realizadas en los estudios piloto de degradación del polímero, reportaron máxima absorbancia a esa longitud de onda. La cuarta causa de variación fue la interacción entre pH y concentración, debido a esto se utilizó un medio con alta capacidad de amortiguamiento PBS 0.1 M y se cambió cada semana para garantizar que el pH no cambiara

durante el ensayo, ya que está demostrado que el pH del medio afecta la degradación del polímero (Makadia y Siegel, 2012).

Lo anterior permitió hacer lecturas sobre muestras estables, dando más confianza en la información obtenida.

## 5.5 Resultados de la cinética de degradación en tiempo real

En esta sección se analizaron los cambios observados en el volumen, peso y porosidad (Espacios vacíos) del dispositivo de prueba, junto con la cantidad de polímero que se liberó al medio.

### 5.5.1 Balance de masas

El proceso de degradación al cual están sujetas las probetas debe cumplir la ley de la conservación de la masa, es decir, la masa inicial ( $M_o$ ) de cada probeta debe ser igual a la masa después de finalizado el ensayo ( $M_d$ ).  $M_d$  es el resultado de sumar la masa de las probetas después de secarse ( $M$ ) junto con la cantidad de polímero liberada al medio, cuantificada por UV VIS ( $M_l$ ), en cada punto de la observación. El porcentaje de diferencia (PD) entre los dos valores anteriormente mencionados debe ser lo más cercano a 0, esto permite tener confianza sobre la metodología empleada y los datos obtenidos.

Se presentan los resultados obtenidos en la **Tabla 5-14**.

**Tabla 5-14** Balance de masas en el experimento

Semana	Probeta	$M_o$ (mg)	$M$ (mg)	$M_l$ (mg)	$M_d$ (mg)	PD (%)
2	1	171,51	171,02	0,35	171,37	0,07
	2	172,93	172,32	0,58	172,91	0,01
	3	174,54	174,47	0,40	174,87	-0,19
	4	173,74	173,47	0,24	173,72	0,01

	5	181,98	182,31	0,22	182,53	-0,30
	6	177,62	177,73	0,26	178,00	-0,21
4	7	174,77	174,62	0,54	175,17	-0,22
	8	168,96	168,83	0,85	169,69	-0,43
	9	180,79	180,99	0,69	181,68	-0,49
	10	173,80	173,59	0,59	174,18	-0,22
	11	176,55	173,81	0,73	174,55	1,13
	12	172,47	172,26	0,56	172,83	-0,24
6	13	181,30	180,36	0,97	181,33	-0,01
	14	185,00	185,15	1,17	186,33	-0,70
	15	173,67	165,38	1,34	166,73	3,96
	16	185,55	186,07	0,80	186,88	-0,71
	17	170,90	168,35	1,19	169,54	0,79
	18	181,52	181,50	0,86	182,36	-0,46
8	19	177,88	177,72	1,23	178,96	-0,61
	20	188,67	186,22	1,63	187,86	0,42
	21	184,75	177,24	1,94	179,19	3,00
	22	183,88	181,82	1,28	183,10	0,42
	23	181,35	178,34	1,70	180,05	0,71
	24	179,99	180,40	1,19	181,59	-0,89
10	25	183,19	181,53	1,73	183,27	-0,04
	26	174,11	149,71	2,61	152,32	12,51
	27	178,82	147,86	2,98	150,85	15,64
	28	179,50	176,14	1,87	178,02	0,82
	29	180,71	151,63	2,80	154,43	14,53
	30	173,93	140,47	2,11	142,59	18,01

Se observa que en la semana 10, el porcentaje de diferencia de los últimos seis datos de la tabla incrementó considerablemente, alcanzado valores de hasta 18%; este comportamiento se debió a que las probetas en ese punto del ensayo se fracturaron y desprendieron partículas al medio. En este caso la masa que se cuantificó correspondió al polímero solubilizado en el medio y se descartó el polímero fragmentado desde la probeta; por cuanto estos fragmentos evidencian que en ese instante la probeta ha perdido su integridad y los fragmentos pueden considerarse inductores de reacciones no deseadas en el organismo.

Lo anterior permite advertir que bajo las condiciones de experimentación y el método usado para fabricar las probetas, puede presentarse este fenómeno de fraccionamiento de la estructura cuando esté implantada *in vivo*; lo cual implicaría perder el control de la cinética de

degradación. Además, existiría la posibilidad que sus partes fraccionadas activen la respuesta inmune o fagocitaria si las partículas del dispositivo tienen diámetros de 10  $\mu\text{m}$  o menores (Hallab, 2012; y Yang y Webster, 2012); de igual manera podría generar fibrosis en la zona de implantación (Wang, Ameer, Sheppard y Langer, 2002), o incrementar la degradación en el sistema y consecuentemente reducir el pH de la zona circundante generando complicaciones en la rehabilitación del paciente.

El método de ALM da lugar a estructuras con diferentes comportamientos mecánicos dependiendo como se aplique la fuerza, es decir, genera estructuras anisotrópicas; y aunque la bibliografía reporta este hecho como positivo al tener el hueso el mismo comportamiento, vale la pena investigar el efecto que tiene el desprendimiento de partículas durante la degradación asociado a este método de fabricación. No obstante, este método tiene como ventajas que no usa ningún solvente, genera pérdidas mínimas de material y sirve para hacer diferentes geometrías y tamaños.

### 5.5.2 Resultados del análisis estadístico

Para analizar la información obtenida en las secciones 4.7.1, 4.7.2, 4.7.3, y 4.7.4 se hizo un análisis multivariado de varianza (MANOVA) (**Tabla 5-15**) usando el software estadístico R.

**Tabla 5-15** Análisis multivariado de varianza para las variables de estudio

Variable	gl	gl num	gl dem	Pillai	F aproximada	P-valor
Geometría	1	5	10	0,7188	4,9176	0,0157
Carga	2	10	22	1,0868	2,6185	0,0287
Tiempo	4	20	52	2,0213	2,6559	0,0025
Carga*Tiempo	8	40	40	2,4425	1,6713	0,0299
Residuos	14					

En el **Tabla 5-15** se observa con un nivel de significancia del 5%, que el tiempo y la carga afectaron las variables respuesta. La carga como factor individual afectó una variable

respuesta, pérdida de masa, de una forma diferente, y afectó las demás variables de salida siempre y cuando esta tuviera interacción con el tiempo.

El p-valor en el caso de la geometría indica que se realizó un buen bloqueo, es decir hay indicios que la geometría afectó las variables de salida, aunque esto requiere más experimentación; ya que al tratarse de un bloque no tiene sentido realizar pruebas de hipótesis; Así mismo la bibliografía reporta que la geometría y más específicamente la escala afecta la degradación (Burkersroda et al., 2002).

### **Masa perdida en las probetas**

Los resultados primarios se encuentran en la **Tabla 5-14**. Durante el experimento se presentó una tendencia a perder masa a medida que transcurría el tiempo, a pesar de la variabilidad en la semana 9-10, lo cual es coherente con la bibliografía consultada; conviene subrayar que esta tendencia fue mayor en las probetas cilíndricas (ver **Figura 5-6**) y se aceleró después de la semana 8, esto también fue observado por Guo et al., 2016 con probetas de PLGA hechas a partir de moldeo por inyección.

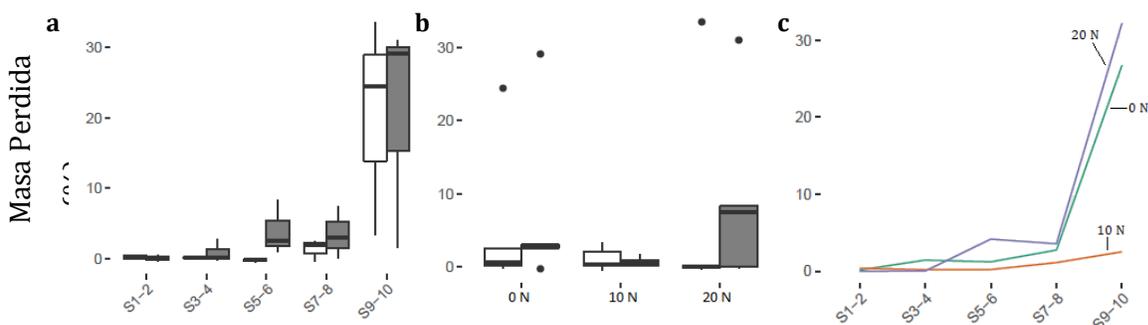
Se realizó una prueba de Tukey para determinar cuál fue la carga que hizo perder más masa en las probetas y se determinó que sin carga y a 20 N se pierden cantidades de masa similar, siendo un poco mayor a 20 N; contrario a la carga de 10 N que no presentó pérdidas de masa significativas tanto en probetas tetragonales como cilíndricas. Este comportamiento pudo estar relacionado con un estado de equilibrio o un retardo en el proceso causado por esta carga; es decir, con 10 N pudo haber actuado como una barrera e impedido que ingresara el medio de la forma en la que lo hizo con las probetas que no estaban sujetas a carga (0 N), pero al mismo tiempo no fue lo suficientemente decisiva como la carga a 20N, que afectó la estructura de la probeta más rápidamente en comparación con las otras cargas y debido a esto también presentó degradación. Fan et al., 2008 reporta que en el caso de cilindros de PDLA que estaban sujetos a mayor carga, estos perdieron más masa y se degradaron más que los que no tenían carga; lo anterior teniendo en cuenta que en el estudio se trabajaron cargas de tensión (15 y 25 N) y compresión (100 N) combinadas.

En cuanto al efecto de la interacción entre la carga mecánica y la geometría (**Figura 5-6 b**), se observó una mayor pérdida de masa para las probetas sujetas a la carga de 20 N con geometría cilíndrica; contrario a las probetas tetragonales, que perdieron menos masa; esto también ocurrió sin carga (0 N); pero con 10 N sin importar la geometría, la masa se mantuvo constante.

En la interacción entre las variables tiempo y carga se encontró que la pérdida de masa (**Figura 5-6 c**) fue levemente mayor durante la semana 1 a la 4 para las probetas sin carga. Esto pudo ser causado por la falta de presión en estas probetas y porque tenían mayor área expuesta, que hizo que su comportamiento presentara más cambios.

Durante las semanas 4 a la 8 se observó interacción entre el tiempo y la carga, excepto para las probetas sujetas a carga de 10N, y a partir de la semana 7 el efecto del tiempo fue mayor que el efecto de la carga. Esto pudo haber sido causado por un estallido repentino en la degradación, es decir, se acelera la degradación del material indicando que el mecanismo se relaciona erosión en masa.

**Figura 5-6** Interacción entre tiempo, geometría y carga para masa pérdida



Interacción geometría vs. tiempo (a), geometría vs. carga (b) y carga vs. tiempo (c).

Probetas tetragonales (Blanco), Probetas cilíndricas (Gris).

Cabe resaltar que las probetas, tanto tetragonales como cilíndricas, mostraron una tendencia a adherirse a las superficies del sistema de carga, hecho en acero inoxidable; cuanto más tiempo estuvieron adheridas, mayor tiempo conservaron su integridad y fue menos probable que se fragmentaran y perdieran masa. Se consideraría que esta situación también podría

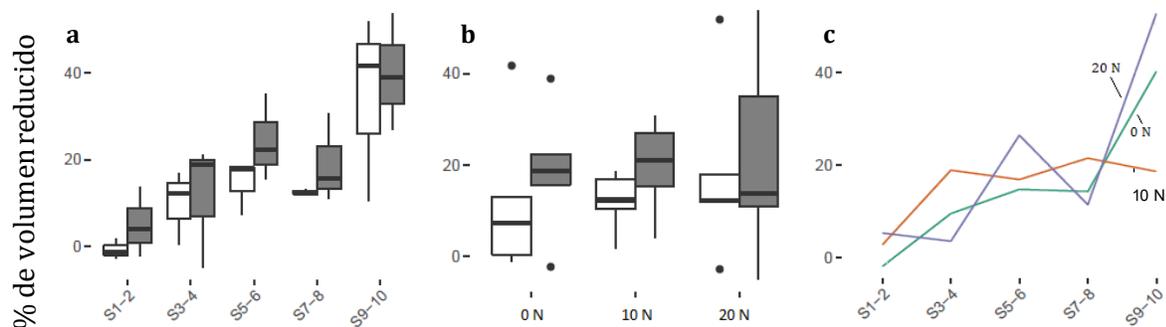
ocurrir *in vivo*, en especial cuando hay fuerzas a compresión y no hay necesidad de abrir el sistema para hacer cambios de medio.

Por otro lado, la pérdida de masa no necesariamente implica que se está degradando la probeta. Debido al método de manufactura y a las condiciones de cargas, algunas probetas se fraccionaron, pero aun así no se degradaron esos fragmentos; por esta razón hubo una variación en la pérdida de masa grande que no se compensa con la concentración de polímero liberada al medio. Lo anterior permite inferir que una vez se implante un dispositivo con características similares a los dispositivos fabricados en esta investigación se recomienda limitar movimientos de cizalla y torsión.

### **Cambios en el volumen de las probetas**

El porcentaje de volumen perdido incrementó teniendo en cuenta los factores geometría y tiempo; en las semanas 2, 6 y 8 la geometría cilíndrica redujo más su volumen en comparación con la geometría tetragonal (**Figura 5-7 a**). Lo anterior también se observó cuando se evaluó la geometría en interacción con la carga donde las probetas cilíndricas redujeron más su volumen que las tetragonales en todas las cargas aplicadas; sin embargo, no se logró determinar que carga tuvo más efecto en el volumen (**Figura 5-7 b**). La prueba de Tukey para la variable de volumen no arrojó diferencias significativas en las cargas.

En la **Figura 5-7 c**, las interacciones de carga y tiempo estuvieron presentes hasta la semana 8, y a partir de esta semana, el cambio de volumen de las probetas sujetas a cargas de 20 N y sin carga dependió solo del tiempo. Durante el ensayo las probetas sujetas a 10 N mostraron que el efecto de la carga dependió también del tiempo para generar cambios en el volumen, aunque estos efectos fueron más estables en comparación con las otras cargas.

**Figura 5-7** Interacción entre tiempo, geometría y carga para el cambio de volumen

Interacción geometría vs. tiempo (a), geometría vs. carga (b) y carga vs. tiempo (c).

Probetas tetragonales (Blanco), Probetas cilíndricas (Gris).

### Cambios en la porosidad de las probetas

Las variables densidad relativa y porosidad son inversamente proporcionales, por tanto solo se reportaron los resultados del porcentaje de variación de la porosidad, ya que relacionan la densidad real y aparente de cada probeta durante el experimento, permitiendo normalizar la variable estudiada. Las probetas mostraron tendencia a reducir su porosidad a medida que pasaba el tiempo, pero se observó mayor reducción de porosidad en las probetas cilíndricas que en las tetragonales (**Figura 5-8 a**). Este fenómeno se pudo haber dado porque las probetas tetragonales tienen esquinas y el medio no puede entrar con la misma facilidad como lo hizo con las probetas cilíndricas que tienen un área más expuesta y regular en comparación con las probetas tetragonales, lo anterior teniendo en cuenta los lados de las probetas y no su superficie superior e inferior.

Para la mayoría de las variables, la semana 8 fue determinante en el comportamiento de las estructuras, sin embargo la porosidad se mantuvo constante a partir de la semana 5 y hasta finalizar del ensayo; este comportamiento puede asociarse a una etapa de reacomodación de la estructura y también se observó en el trabajo de Felfel (2013), donde la densidad de barras de PLA se mantuvo constante después de 60 días de degradación bajo condiciones similares de experimentación (PBS a 37 °C); en este caso la densidad se midió por picnometría.

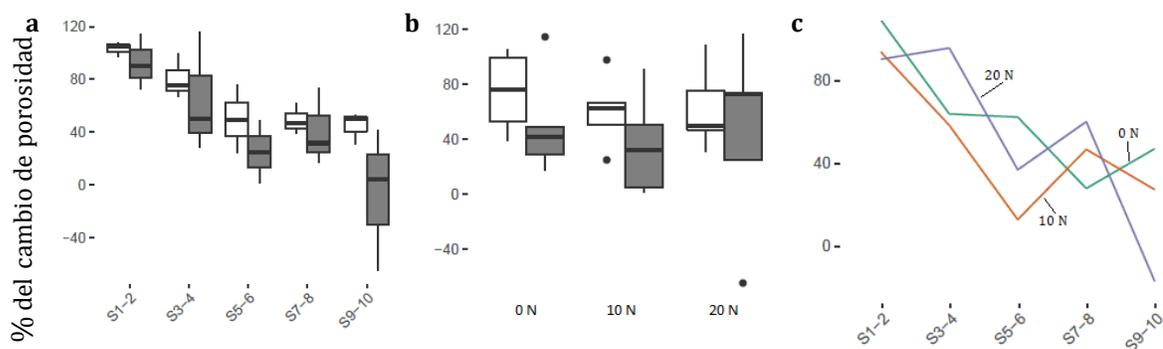
En cuanto al efecto único de la carga sobre la porosidad de las probetas, se observa en la prueba de Tukey que las medias son iguales en los tres niveles de carga, es decir, la carga por sí sola no generó la acomodación de las estructuras de las probetas.

La interacción entre la geometría y la carga para la variable porosidad (**Figura 5-8 b**) mostró que las probetas tetragonales presentan menor variación de la porosidad que las probetas cilíndricas a 0 y a 10 N, pero a 20 N sus medias están más cercanas, esto podría sugerir que esta carga en un menor tiempo hizo que ambas probetas se comportaran de una manera similar en todas las variables de salida excepto en la masa pérdida.

Aunque estadísticamente la geometría no es significativa debido a la variabilidad; esto también podría indicar que la estructura de las probetas tetragonales es más resistente y por eso cambió menos.

Por último, en la interacción entre carga y tiempo (**Figura 5-8 c**) se observó que las probetas sin carga y a 20 N presentaron comportamientos similares, los cuales estuvieron influenciados tanto por la carga como por el tiempo, pero para las probetas sujetas a la carga de 10 N el efecto fue menor.

**Figura 5-8** Interacción entre tiempo, geometría y carga para cambio en la porosidad



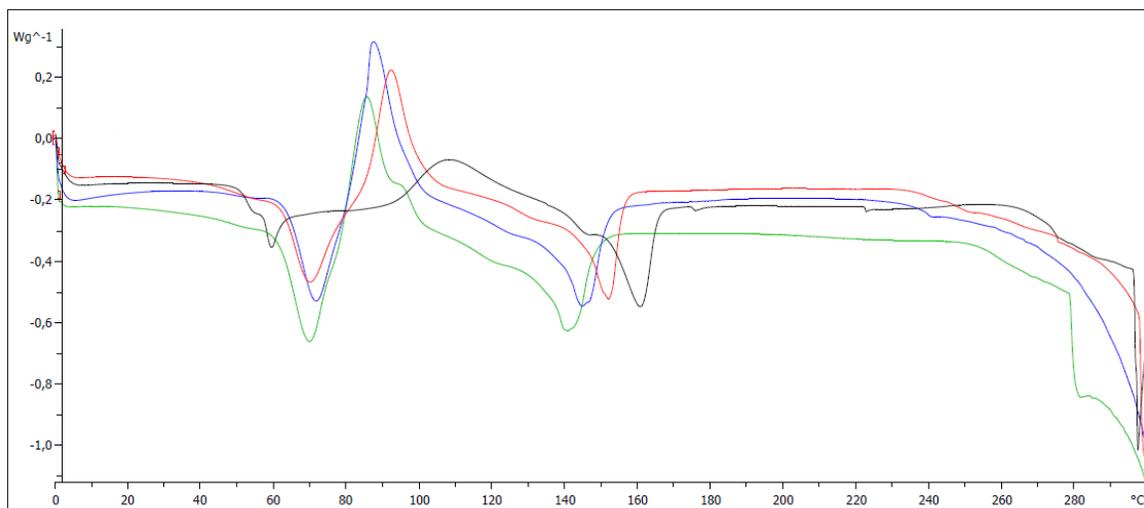
Interacción geometría vs. tiempo (a), geometría vs. carga (b) y carga vs. tiempo (c) para la variable Porosidad. Probetas tetragonales (Blanco), Probetas cilíndricas (Gris).

### 5.5.3 Cambios en el comportamiento térmico del material

Para analizar el comportamiento térmico del material a lo largo del ensayo se tomó una muestra del material sin procesar (**Figura 5-2**) y muestras de las semanas 3 (Negro), 4 (Rojo), 9 (Azul) y 10 (Verde) del experimento (**Figura 5-9**), con el fin de comparar el material antes y después de haber pasado por las condiciones térmicas y mecánicas del proceso de manufactura y conocer cómo las condiciones ambientales del ensayo modificaron las propiedades físicas del dispositivo de prueba.

Lo anterior permite conocer cómo la estructura del material cambió mientras el dispositivo de prueba se degradaba y hasta qué punto el material se comportó como un sólido y conservó su forma. Todos los termogramas se tomaron en el segundo barrido.

**Figura 5-9** Cambios el termograma del PLGA procesado a lo largo del ensayo



**Tabla 5-16** Parámetros hallados en los termogramas

	Pellets	Semana 3	Semana 4	Semana 9	Semana 10
Segmento de transición (°C)	45,41-61,26	46,58-56,63	28,61-56,63	34,39-49,51	27,97-50,15

Temperatura de transición (°C)	57,08	51,12	45,23	42,33	40,72
$\Delta C_p$ (J/gK)	0,509	0,313	0,329	0,008	0,194
Segmento de cristalización (°C)	0	83,68-138,86	84,52-112,86	80,80-104,08	79,04-105,97
Temperatura de cristalización (°C)	0	108,3	92,27	87,48	85,72
Área de cristalización (mJ)	0	336,39	295,94	396,09	336,95
Segmento de fusión (°C)	134,33-173,55	139,66-169,28	117,77-159,65	114,06-157,88	109,47-152,06
Temperatura de fusión (°C)	160,4	160,69	151,88	144,68	140,69
Área de fusión (m)	-515,13	-276,39	-367,6	-419,03	-374,26
Porcentaje de cristalinidad (%)	36,164	49,863	53,588	61,657	61,606
Peso (mg)	15,3	13,2	13,3	14,2	12,4

El primer evento observado en la **Figura 5-9** fue la transición vítrea, cuyo salto de línea base se suavizó al transcurrir el experimento, es decir se redujo el delta de capacidad calorífica y su temperatura de inflexión (**Tabla 5-16**); este comportamiento se debió a que el material primero degradó su parte amorfa, por eso esta transición tuvo tendencia a desaparecer al quedar menos material amorfo como lo reporta Välimaa y Laaksovirta, 2004; Li et al., 2010; Larrañaga et al., 2014 y Teodora et al., 2015. El decremento en la temperatura de inflexión se atribuye a pérdida de peso molecular amorfo (Göpferich, 1996 y Schliecker et al., 2003); Así mismo, Jamshidi et al., 1988 reportaron que la temperatura de transición del PLGA disminuye con la reducción de láctico en la composición del copolímero y con la reducción del peso molecular. Álvarez y Mantilla, 2009 mencionan que este fenómeno se debe a que el medio actuó como plastificante en el material.

Este comportamiento podría provocar que el dispositivo de prueba perdiera su consistencia cuando su Tg sea igual o inferior a la temperatura ambiente (37 °C), por tanto la zona de implantación debería contener el dispositivo para evitar que se deforme y para ese entonces (después de 10 semanas) el dispositivo ya debe haber cumplido su función sin importar que todavía conserve parte de su masa.

---

Seguido de la transición vítrea se observó un pico endotérmico, indicio que el polímero ha sufrido un relajamiento, es decir, que a medida que se incrementaba la temperatura en el equipo de DSC, las cadenas del polímero se reacomodaban a una velocidad moderada ya que había más volumen disponible, debido a la degradación; la energía usada en dicho relajamiento varió de acuerdo a los segmentos cristalinos o amorfos que se estuvieran desplazando, ya que lo primero en degradarse fue la parte amorfa, entonces hubo una tendencia a incrementar dicha energía porque se deben mover segmentos cristalinos.

Posteriormente al incrementar la temperatura en el equipo de DSC se empezaron a organizar las cadenas, pero no formaron cristales nuevos ya que el difractograma (**Figura 5-10**) muestra los mismos ángulos de difracción durante el tiempo de experimentación. Este evento fue exotérmico y marcó la cristalización del material porque los segmentos de las cadenas se podían mover y organizar de una mejor manera para formar segmentos cristalinos. Lo anterior en un dispositivo implantable implicaría mejorar sus propiedades mecánicas por un periodo específico durante el tiempo de degradación.

Posteriormente el equipo de DSC siguió incrementando la temperatura y se inició la fusión del material, donde los cristales que se habían formado entre 79 y 135 °C se volvieron inestables y la masa se volvió líquida, se observó que a medida que se degrada el material, la temperatura de fusión decrecía en lugar de incrementar, esto se pudo deber a que partes amorfas que permanecieron a pesar de la degradación se ubicaron entre segmentos cristalinos haciendo que el material tuviera segmentos cristalinos debido a la degradación, pero aislados ya que la parte amorfa contaminó la cristalina; de igual manera el material quedó con más extremos de cadenas libres que hicieron que se redujera la temperatura de fusión en comparación con la temperatura inicial que tenía el material; y por último esto también demostró una pérdida en el peso molecular del polímero.

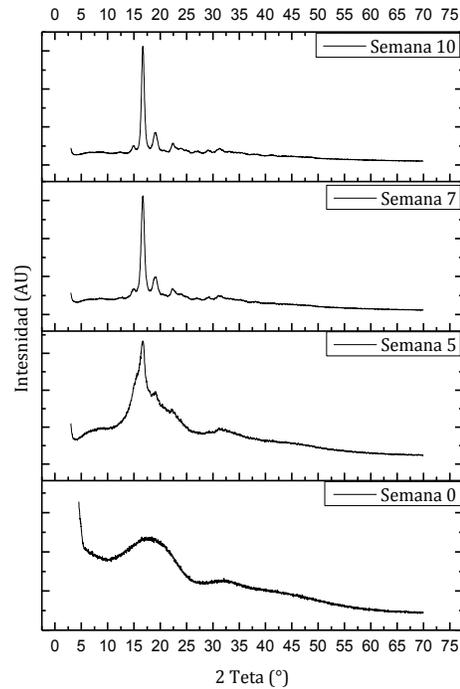
El porcentaje de cristalinidad aumentó a medida que la probeta se degradaba, lo cual es coherente con los difractogramas que se presentan en la sección 5.5.4 y con la bibliografía consultada (Välimaa y Laaksovirta, 2004). Por otro lado, Dreher et al., 2013 en su investigación concluyen que la cristalinidad aumentó debido a la carga tensil aplicada; este comportamiento no se observó en la presente investigación en primera medida por la magnitud de las cargas

que se eligieron (0, 10 y 20 N) y por las muestras que se seleccionaron para hacer el análisis térmico, estos autores también mencionan que no hubo formación de nuevos cristales. Sin embargo, cabe resaltar que el incremento en la cristalización no es un evento que esté asociado única y directamente a la carga mecánica a la que está expuesto un material semicristalino, ya que en este trabajo de investigación el porcentaje de cristalinidad del material incrementó independientemente de la carga aplicada porque la parte amorfa del polímero se degradó primero, la carga mecánica aceleró la degradación, pero no de una forma directamente proporcional. Este comportamiento es decisivo en aplicaciones médicas ya que un incremento en la cristalinidad del material en un primer momento va a mejorar las propiedades mecánicas del implante, pero posteriormente va a comprometer su integridad estructural.

#### 5.5.4 Cambios en la estructura Cristalina de las probetas

Se sabe que el polímero trabajado en esta investigación tiene un 18 % de poli glicólico y un 82 % de L- poli láctico, el primero es amorfo y el segundo es un polímero semicristalino, así que se evaluó como cambia la cristalinidad del L- poli láctico durante el ensayo con probetas en la semana 0 (antes de iniciar la degradación) y con probetas tomadas de las semanas 5, 7 y 10 de la degradación.

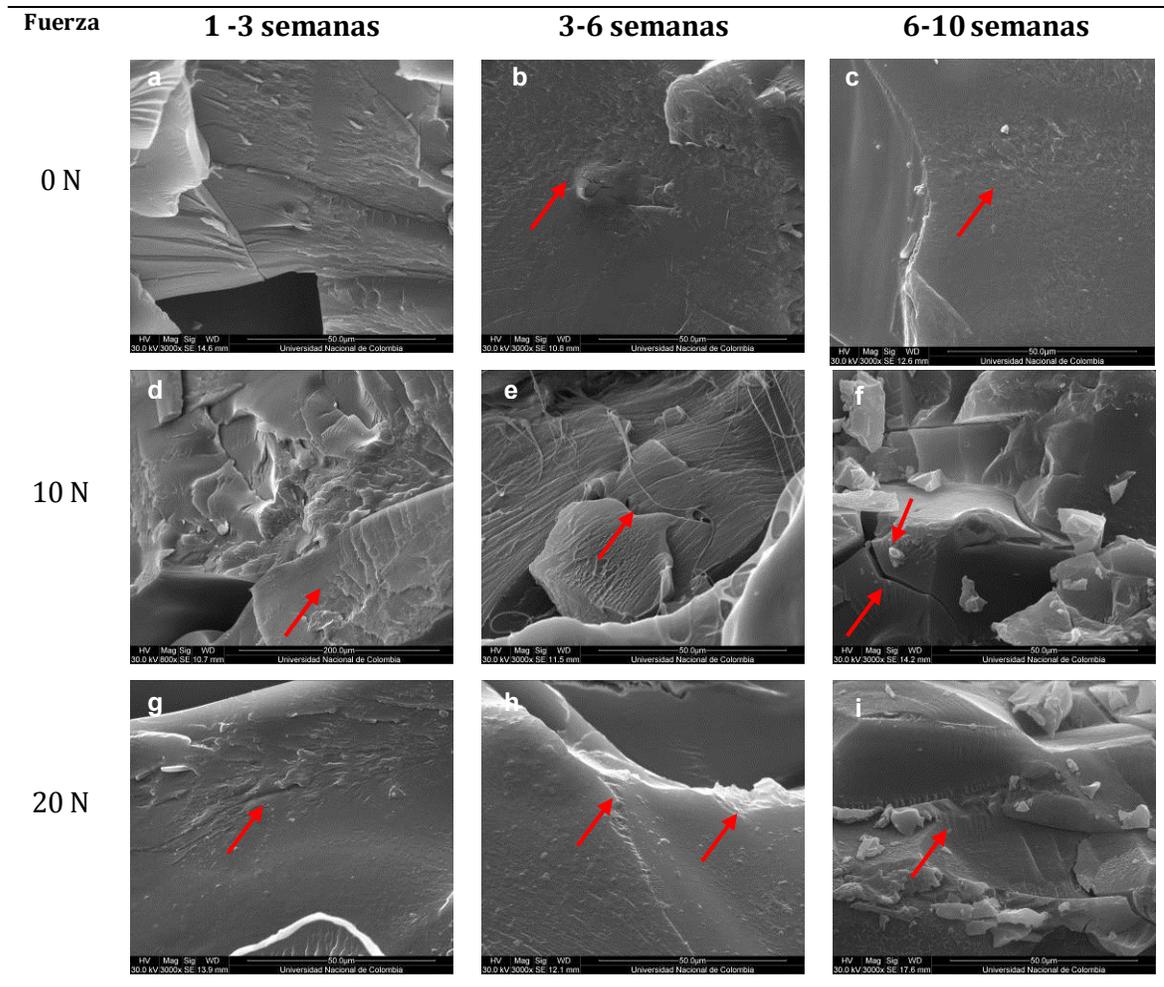
En la **Figura 5-10** se observó que la muestra al inicio del ensayo presentó un comportamiento amorfo dado que no hubo ningún pico en el difractograma; con el paso del tiempo la parte amorfa se desprendió del material por escisión de la cadena, y permitió ver la parte cristalina, que es igual a la reportada en la bibliografía (Spiridon et al., 2013; Shabanian 2014; Larrañaga et al., 2014; M. Maiza et al., 2015), esta presentó difracción en  $16,9^{\circ}$ ,  $19,0^{\circ}$ ,  $22,5^{\circ}$ , siendo más intensa en el primer ángulo, lo cual confirma que el polímero no tenía transiciones cristalinas polimórficas, es decir, que a medida que se degradaba el polímero no se formaban nuevos núcleos de cristalización.

**Figura 5-10** Cambios cristalográficos del PLGA durante la degradación

### 5.5.5 Cambios micro estructurales

Se tomaron fotografías SEM de las probetas durante el ensayo, estas fueron fracturadas usando nitrógeno líquido con la intención de analizar un perfil interno de las mismas, ya que la parte externa tomó la forma de las placas de acero inoxidable.

**Tabla 5-17** Cambios microscópicos en el PLGA de acuerdo con el tiempo y la carga aplicada



Se observó que a medida que pasaba el tiempo, las superficies internas de las probetas se volvieron más rugosas y mostraron más imperfecciones sin estar sujetas a carga (0N), es decir, mostraron erosión en la superficie, aunque no se observaron grietas ni desprendimiento de fragmentos; el desprendimiento de fragmentos solo fue evidente en las semanas 6 a 10 y fue mínimo.

En los casos en que las probetas estaban sujetas a cargas de 10 y 20 N se observó desgaste en la superficie, habiéndose presentado desgaste en las primeras semanas del ensayo; de igual manera el desprendimiento de fragmentos se dio en una etapa temprana y fue más evidente en las probetas con carga a compresión de 10N.

---

Otro fenómeno que se presentó durante el ensayo fue la estratificación o formación de capas de PLGA en las probetas sujetas a 10 y 20 N, este fenómeno fue causado por la erosión, el desplazamiento de PLGA y su sedimentación. Estas capas de sedimento crean el patrón de bandas visibles en las micrografías de la **Tabla 5-17 e, g y h** y también generó cambios de textura. Esta sedimentación puede ser un indicio de cómo el medio intervino la probeta, que junto con la información de la sección 5.5.6 se puede inferir que no intervino la probeta de forma homogénea ni estática.

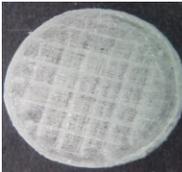
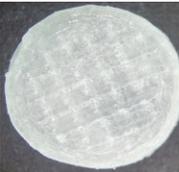
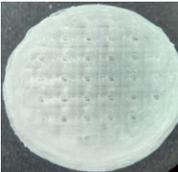
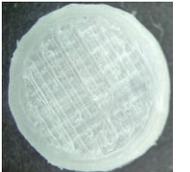
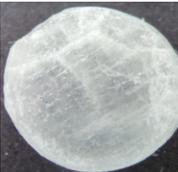
Cabe resaltar que las fracturas que se observan en las fotografías (**Tabla 5-17 a y d**) se deben a la fractura por nitrógeno líquido. El comportamiento observado se asemeja a las fotografías que reportan otros autores en aproximadamente los mismos tiempos de degradación, a pesar de haber utilizado diferentes métodos de fabricación o empleando únicamente PLA (A. Teodora et al., 2015; Fefel, 2013).

Por último, al fracturar las probetas se evidenció que las probetas sujetas a 20 N y aquellas que se degradaron durante tiempos mayores eran más difíciles de fracturar, sugiriendo que el material estaba más compacto y por tanto era más resistente.

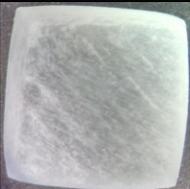
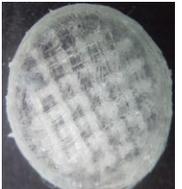
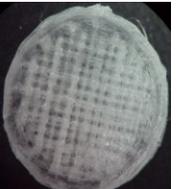
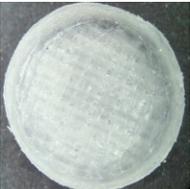
### 5.5.6 Cambios macro estructurales

A continuación se presentan los cambios macro estructurales que sufrieron las probetas cuando estuvieron sujetas a las siguientes fuerzas de compresión: 0N (**Tabla 5-18**), 10N (**Tabla 5-19**) y 20N (**Tabla 5-20**):

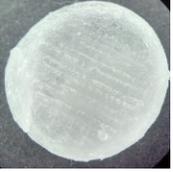
**Tabla 5-18** Comportamiento macroscópico de probetas a 0N

Semana	2	4	6	8	10
Tetragonal					
Cilíndrica					

**Tabla 5-19** Comportamiento macroscópico de probetas a 10N

Semana	2	4	6	8	10
Tetragonal					
Cilíndrica					

**Tabla 5-20** Comportamiento macroscópico de probetas a 20N

Semana	2	4	6	8	10
Tetragonal					
Cilíndrica					

En las **Tabla 5-18, Tabla 5-19** Tabla 5-20 se observó que a medida que transcurría el tiempo, la malla de las probetas se fue uniendo entre sí, formando una superficie sin espacios libres, de igual manera las probetas fueron perdiendo transparencia y se volvieron blancas porque su estructura se cristalizó al perder gradualmente su parte amorfa. Por otra parte, el medio actuó como plastificante.

Las probetas sujetas a 0 N y 20 N se fracturaron a partir de la semana 8 y su color cambió de transparente a blanco en la semana 6; en cambio las probetas sujetas a 10 N no se fracturaron y el cambio en el color se observó solo hasta la semana 10 para el caso de las probetas cilíndricas, las probetas tetragonales permanecieron transparentes durante todo el ensayo.

Los espacios vacíos en las mallas no se cerraron por la carga aplicada ya que en todas las probetas se observó este comportamiento. Estos espacios se cerraron porque el sistema de estudio, probeta y medio, no fue estático y al tener espacios vacíos y estar a 37 °C se favoreció el desplazamiento de la estructura reticulada hasta el punto de convertirse en un sólido compacto sin espacios libres que fue perdiendo su forma gradualmente.

Tanto las probetas tetragonales como cilíndricas mostraron una tendencia a formar conos truncados, es decir, se perdía más material en la parte superior de ambas probetas y las esquinas de las probetas tetragonales se iban redondeando, lo anterior no se aprecia con

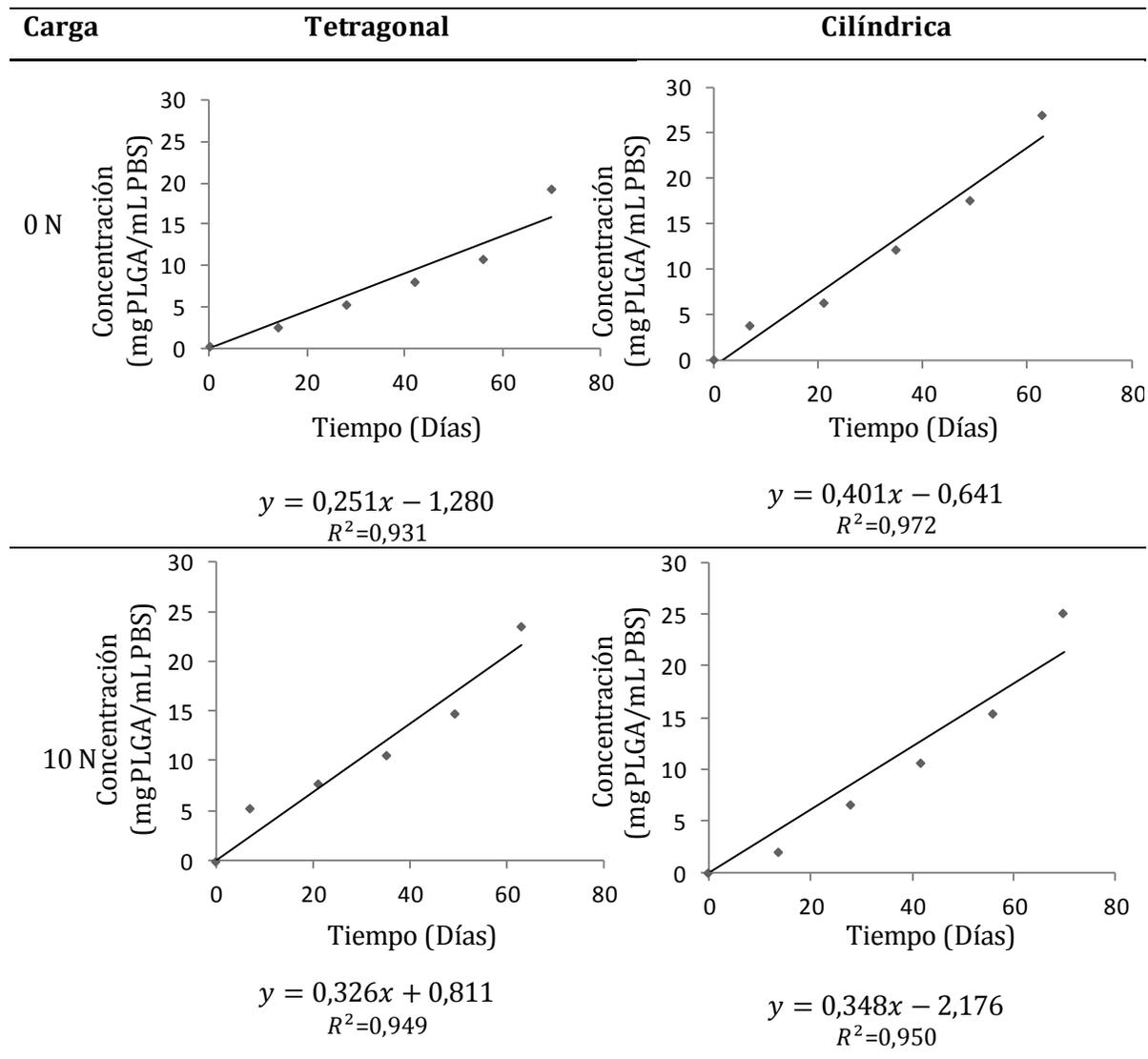
facilidad en las fotografías de las **Tabla 5-18**Tabla **5-19** Tabla **5-20** pero en el estereomicroscopio fue evidente. Este fenómeno indica que las probetas tetragonales sufrieron más cambios en su forma sin que esto signifique que se hubieran degradado más en comparación con las probetas cilíndricas de acuerdo con los resultados que se han presentado.

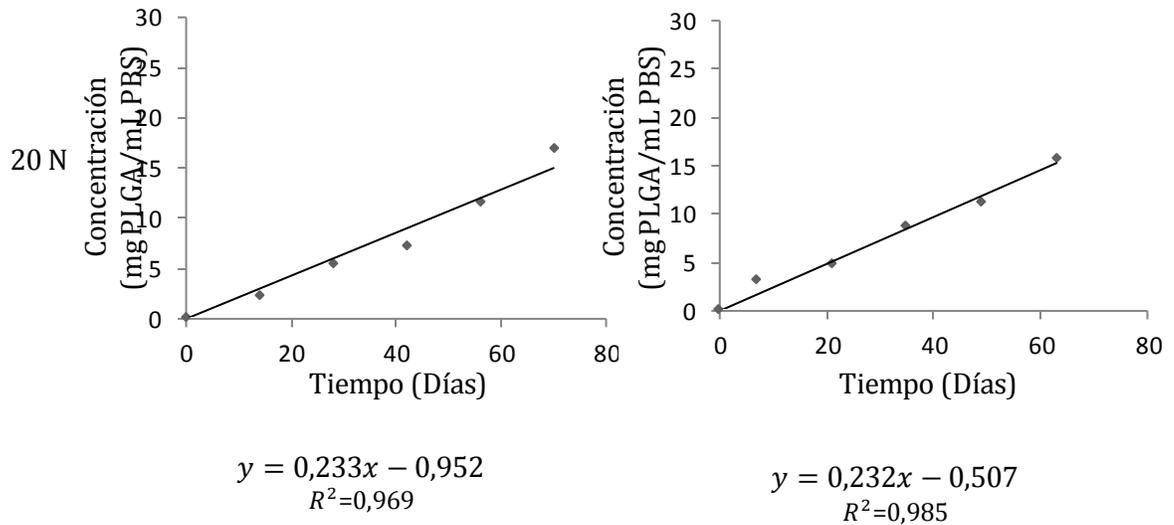
Una explicación a la tendencia de formar conos, es decir, perder más material en la parte superior de la probeta que en la inferior, indistintamente de la geometría, podría explicarse por la densificación de la probeta, que al presentar estratificación hizo que la parte de arriba estuviera menos compacta que la de abajo y por tanto fuera susceptible a desprender material, similar al fenómeno natural que se presenta en *The Green River*, Utah o con las rocas en los desiertos donde la erosión la causa el viento (medio).

En las fotografías macroscópicas se observó que el medio ingresó por capas al dispositivo de prueba, debido a la forma en la que este se imprimió, por esto se da un estallido en la liberación de polímero al medio. Este hidrata el dispositivo de prueba de afuera hacia adentro, lo anterior se observó en el cambio de color durante el ensayo de la parte interna y externa de las probetas.

### **5.5.7 Cinética de degradación del ensayo a 37 °C**

Teniendo en cuenta los procedimientos de la sección 4.5.2 (Polímero liberado al medio) y 4.7.12 (Cinética de degradación a 37 °C), se halló la ecuación de una cinética de orden cero para graficar los resultados que se presentan a continuación separados por tratamientos.

**Tabla 5-21** Cinéticas de degradación del PLGA en el medio



Se observa que todos los tratamientos tienen cinéticas de degradación de orden cero, contrario a lo que reporta Deng et al., en el 2005 y 2008 para PGLA en proporción 90:10 y Lehtonen et al., 2013 para PLDLA con fibra de vidrio; este cambio en el orden de la cinética se debe al tipo de estructura que produce la técnica de fabricación utilizada (Li, Guan, Cui, Shu et al., 2018 y Zhang, Yang, Vo, Feng et al., 2017).

La pendiente a la cual se lleva a cabo la degradación es menor para las probetas tetragonales que para las cilíndricas excepto para la carga a 20N, para el caso de las probetas cilíndricas, la pendiente fue mayor cuando no había carga. El ajuste lineal estuvo entre 0,931 y 0,985. Larrañaga et al., 2014 reportan velocidades de degradación por peso molecular para scaffolds porosos de PLLA de  $0,0112 \text{ días}^{-1}$  y Li et al., 2010 de  $0,122 \text{ semanas}^{-1}$  de scaffolds de PLGA 70:30 hechos por *electrospun* con las mismas condiciones de experimentación de esta investigación, excepto en las magnitudes de carga a compresión. De igual manera López, 2011 reporta valores similares a los de esta investigación, pero los segmenta por etapas en el tiempo. Las diferencias entre los resultados y la bibliográfica citada pueden estar asociadas al método de fabricación, material y a la variable medida, es decir, dependiendo de la variable medida, la cinética y la constante de velocidad pueden cambiar.

**Tabla 5-22** Velocidades de degradación a 37 °C

Carga	Tetragonal (día <sup>-1</sup> )	Cilíndrica (día <sup>-1</sup> )
0 N	0,251	0,401
10 N	0,326	0,348
20 N	0,233	0,232

### 5.5.8 Ajuste al modelo de Hopfenberg

Predecir el comportamiento de degradación del polímero teniendo en cuenta variables como la forma, el tamaño y la porosidad del dispositivo, entendida como espacios vacíos en una estructura, asegura que este tenga el efecto deseado y se pueda controlar y predecir su comportamiento. Teniendo en cuenta lo anterior, se trabajó el modelo de Hopfenberg (Ecuación 5, Sección 2.6) (Hopfenberg 1976; Lin y Anseth, 2009; Shaikh et al., 2015) haciendo la salvedad que al polímero trabajado en esta investigación no le fue incorporado un principio activo. Debido a lo anterior, el primer término de la ecuación desaparece, por estar asociado a un principio activo quedando la ecuación 20:

$$\frac{m_t}{m_\infty} = \left[ 1 - \frac{k_0 t}{C_L a_0} \right]^n \quad (20)$$

Donde,

$\frac{m_t}{m_\infty}$  = Fracción de polímero liberado en el tiempo t,

$k_0$  = Constante de velocidad de orden cero, describe la degradación del polímero,

$C_L$  = Carga inicial del sistema,

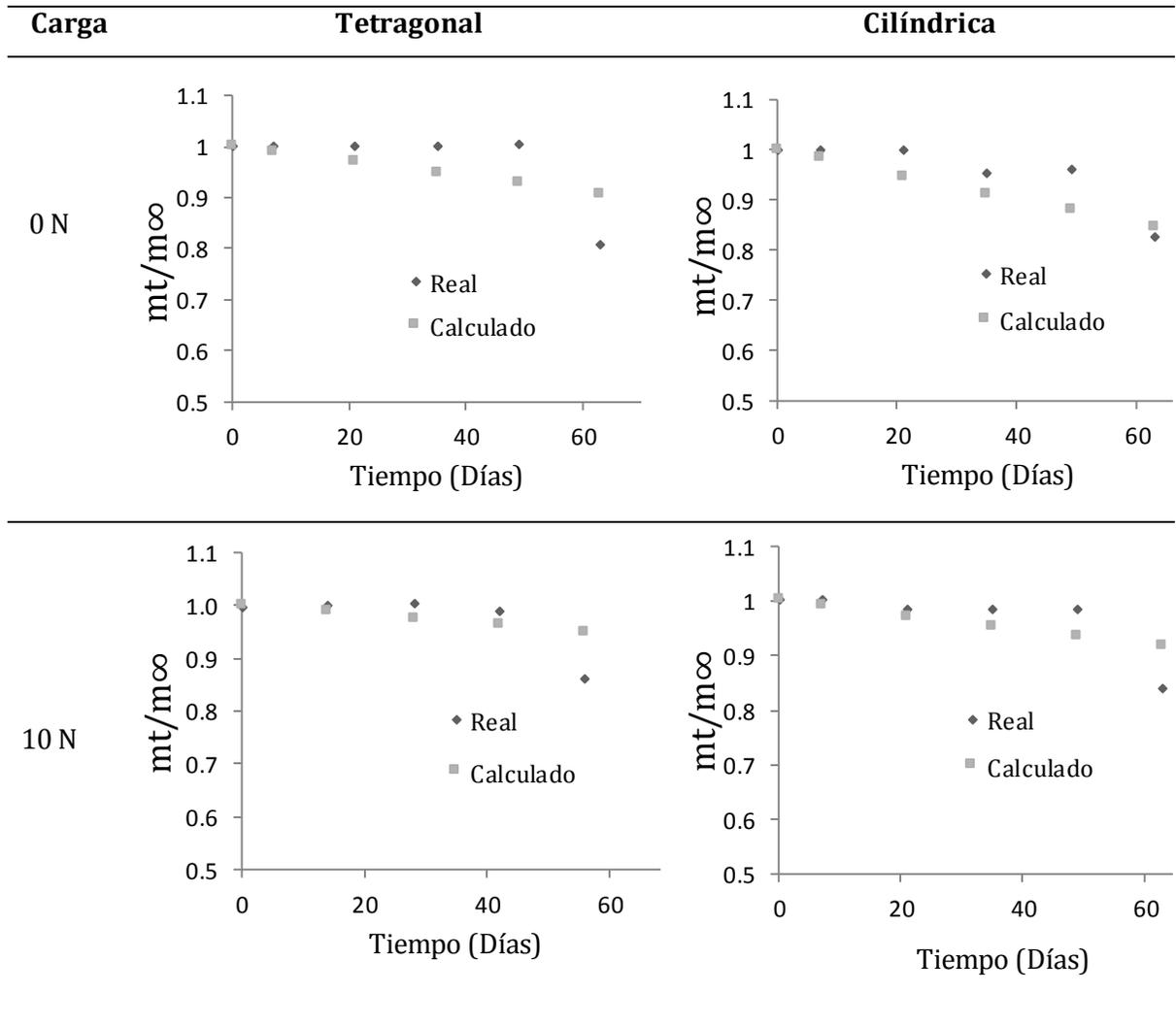
$a_0$  = Grosor medio del sistema (Radio del cilindro),

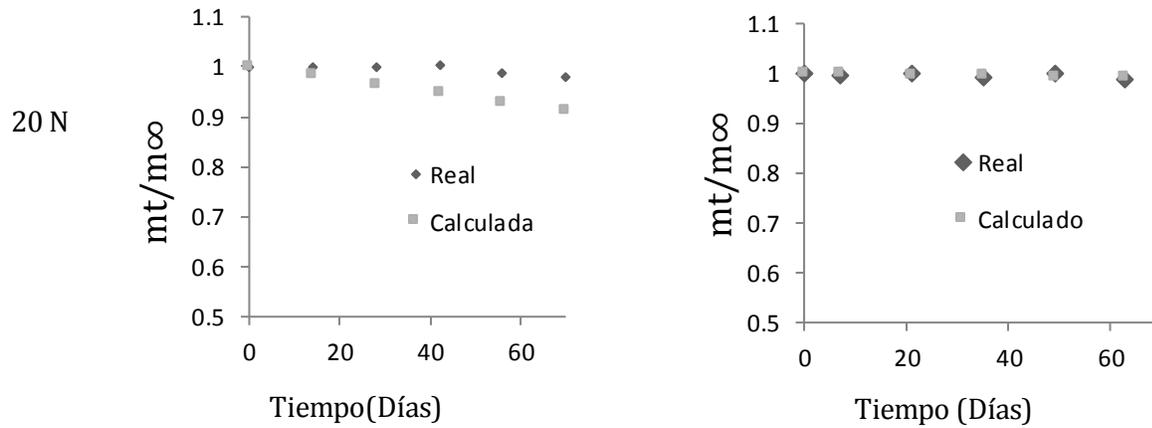
$n$  = Exponente de la geometría, n=1, 2, 3 (plana, cilíndrica y esférico, respectivamente),

$t$  = tiempo.

Referente a la ecuación 20 se aclara que esta aplica para degradaciones cuyo mecanismo sea por erosión y en matrices que no estén cargadas con principios activos. A continuación, se muestran los resultados para los tratamientos hechos a 37 °C:

**Tabla 5-23** Ajuste al modelo de Hopfenberg modificado para cada tratamiento





Del ajuste hecho anteriormente se obtienen los siguientes resultados:

**Tabla 5-24** Parámetros del modelo de Hopfenberg modificado para cada tratamiento

Parámetro	Tetragonal 0 N	Tetragonal 10 N	Tetragonal 20 N	Cilíndrica 0N	Cilíndrica 10N	Cilíndrica 20N
$c_L$	8,897	8,965	8,855	8,915	8,887	8,926
$a$	3,193	3,258	3,203	3,151	3,202	3,028
$n$	1	1	1	2	2	2
Suma de cuadrados	0,019	0,061	0,013	10,693	0,009	0
$K_0$	0,042	0,026	0,036	0,035	0,019	0,001

Se observa que todas las curvas presentaron buenos ajustes al modelo de Hopfenberg teniendo en cuenta los valores de la suma de cuadrados entre la curva del comportamiento real y la curva del comportamiento calculado. La variable  $a$ , grosor del sistema, en el modelo se asume como una constante; sin embargo, su comportamiento fue variable durante la experimentación como se observó indirectamente en los resultados del apartado 5.5.2 (cambios en el volumen); a 37 °C el modelo es indiferente a la variación de este término durante el ensayo.

## 5.6 Resultados de la cinética de degradación en condiciones aceleradas

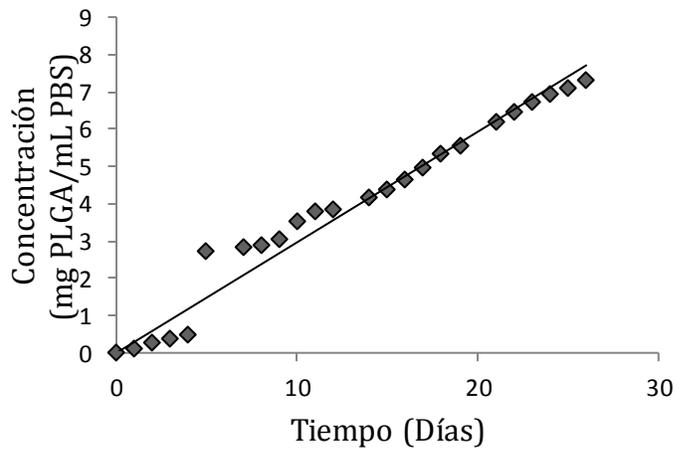
Los datos obtenidos para realizar este análisis se presentan en el anexo 3.

### 5.6.1 Cinética de degradación a 50 °C

Los datos de las observaciones anteriores se graficaron teniendo en cuenta la ecuación 15, donde el exponente es 0, ya que el comportamiento de las muestras durante la degradación acelerada mostró una cinética de orden cero. Con base a lo anterior se hizo una regresión lineal para determinar el valor de  $k$  y su coeficiente de correlación.

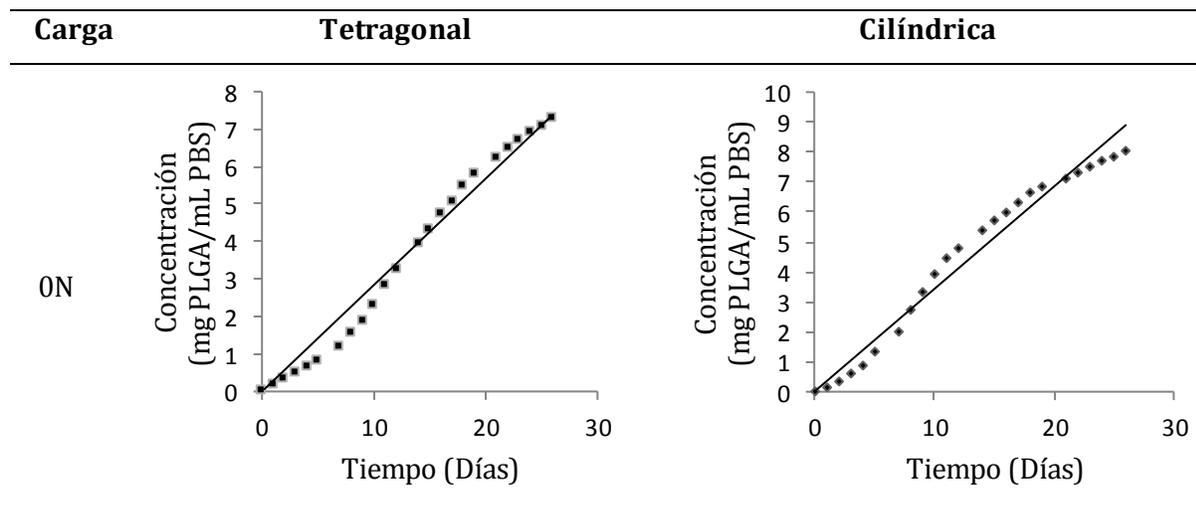
El primer objeto de estudio fue la materia prima sin ser sometida a ningún método de fabricación; según el ajuste que se hizo a los datos, la cinética de degradación es de orden 0 y se observa en la **Figura 5-11**. Se advierte que la materia prima se degradó menos y más lento en comparación con las demás probetas fabricadas y sometidas al ensayo acelerado, a pesar de estas tener forma irregular y varias unidades esparcidas en el medio PBS (mayor área superficial). Lo anterior pudo deberse a que este material no estuvo expuesto a cambios de temperatura ni presión y por tanto esta muestra presentó mayor estabilidad térmica (Farah, Anderson y Langer, 2016).

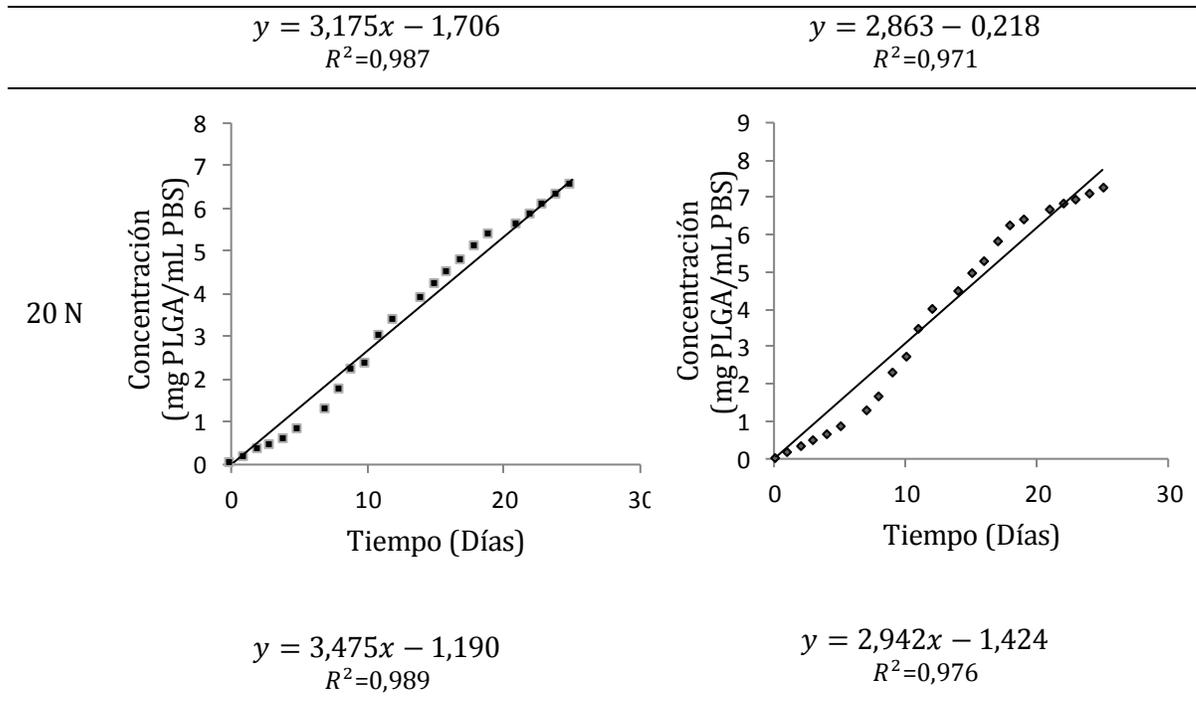
Así mismo la materia prima de las muestras procesadas estuvo sujeta a temperaturas de fusión durante el tiempo que estuvo dentro de la tolva del prototipo de impresión y pudo haber causado degradación térmica y reducir el peso molecular, haciendo que estas probetas se degradaran más rápido que la materia prima sin ser procesada.

**Figura 5-11** Cinética de degradación de orden cero de la materia prima en el medio

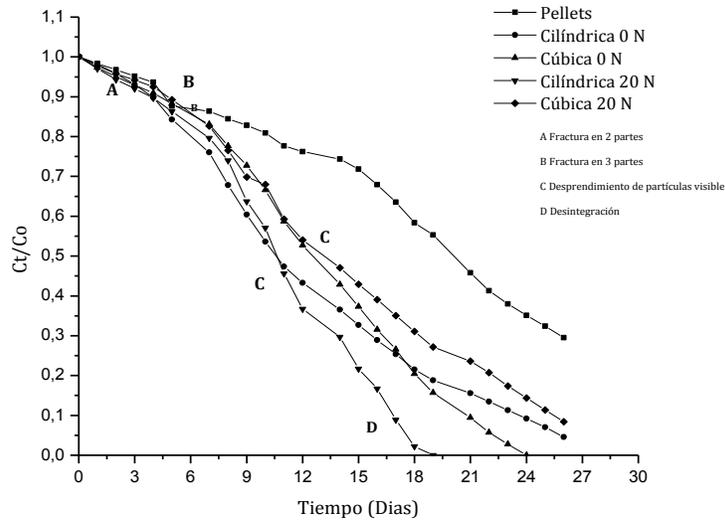
$$f(t) = 3,412 t - 0,360, R^2=0,968$$

En lo concerniente al material procesado (**Tabla 5-25**), las probetas tetragonales y cilíndricas se sometieron a cargas a compresión de 0 y 20N cada una; se observó que estas también experimentaron cinéticas de orden cero; donde la pendiente fue mayor en las probetas tetragonales en comparación con las cilíndricas, y a su vez fue mayor para las probetas sujetas a 20 N.

**Tabla 5-25** Cinética del polímero degradado al medio a 50°C



Cabe señalar que durante el ensayo algunas probetas se fracturaron en diferentes etapas como se muestra en la **Figura 5-12** debido a que el material estuvo sujeto a condiciones experimentales severas ( $50^{\circ}\text{C}$ ) y entró en su zona plástica más rápido, adhiriéndose a las láminas del sistema de experimentación de la **Figura 4-1**. Si la probeta se desprendía de dichas láminas cuando se cambiaba el medio, la fractura ocurría más rápido.

**Figura 5-12** Cambio de la concentración de polímero degradado a 50 °C**Tabla 5-26** Velocidad de degradación a 50 °C

Carga	Tetragonal ( $\text{día}^{-1}$ )	Cilíndrica ( $\text{día}^{-1}$ )
0 N	3,175	2,863
20 N	3,470	2,942

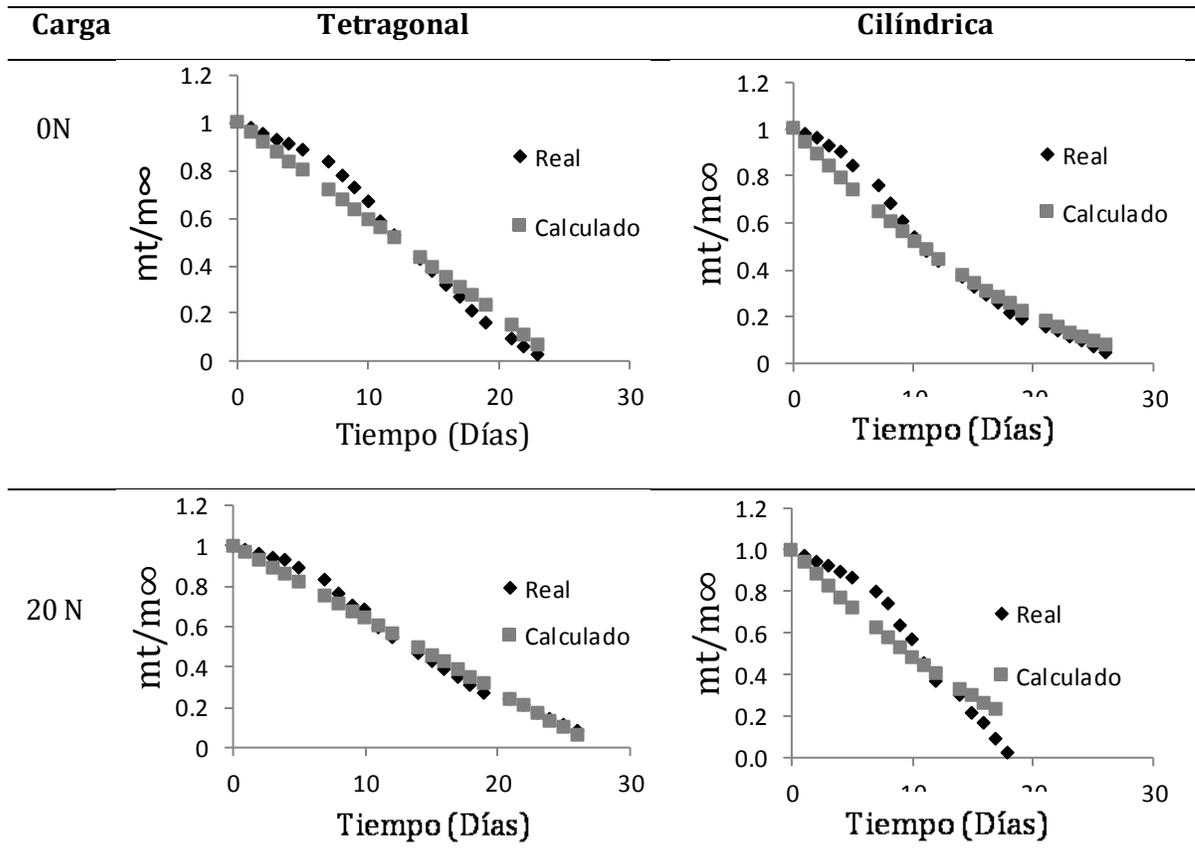
El incremento en la magnitud de cada velocidad es consecuencia directa de haber realizado el ensayo en condiciones aceleradas. Se mantuvo la tendencia que se observó a 37 °C en las probetas tetragonales donde las constantes de velocidad fueron mayores en las probetas sin carga (0N) y en el caso de las probetas cilíndricas, la constante fue mayor a 20N.

### 5.6.2 Ajuste al modelo de Hopfenberg

La materia prima al ser irregular no se correlacionó con el modelo de Hopfenberg ya que este modelo aplica para sistemas con espesor y geometría definida y la materia prima presentó tamaño y forma irregular.

Los resultados del ensayo acelerado para las probetas tetragonales y cilíndricas expuestas a 0 y 20 N se ajustaron al modelo de Hopfenberg (**Tabla 5-27**).

**Tabla 5-27** Ajuste del modelo de Hopfenberg a 50°C



**Tabla 5-28** Parámetros del modelo de Hopfenberg a 50 °C

Parámetro	Tetragonal 0 N	Tetragonal 20 N	Cilíndrica 0 N	Cilíndrica 20N
$c_t$	6,885	7,367	8,469	6,374
$\alpha$	3,029	3,045	3,043	3,139
$n$	1	1	2	2
Suma de cuadrados	0,0677	0,0339	0,062	0,2014

---

$K_0$	0,843	0,810	0,7103	0,605
-------	-------	-------	--------	-------

---

En este caso la suma de cuadrados fue mayor con respecto al ajuste hecho a 37 °C, pero aun así presentó un buen ajuste. En el caso de la probeta cilíndrica sujeta a 20 N, el incremento en la magnitud de la suma de cuadrados pudo deberse a que en el día 10 la probeta comenzó a desprender partículas visibles que se pudieron haber perdido con el cambio del medio diario sin que estas se hubieran degradado por completo, haciendo que la lectura reportada con el tiempo se alejara del valor real.

## 5.7 Efecto de la temperatura en la velocidad de degradación

Teniendo en cuenta las constantes obtenidas en el ensayo a 37 y a 50 °C (**Tabla 5-22** y **Tabla 5-26**), se realiza el esquema de Arrhenius para hallar el valor del factor pre-exponencial  $A$  y la energía de activación  $Ea$  a partir de la ecuación (21):

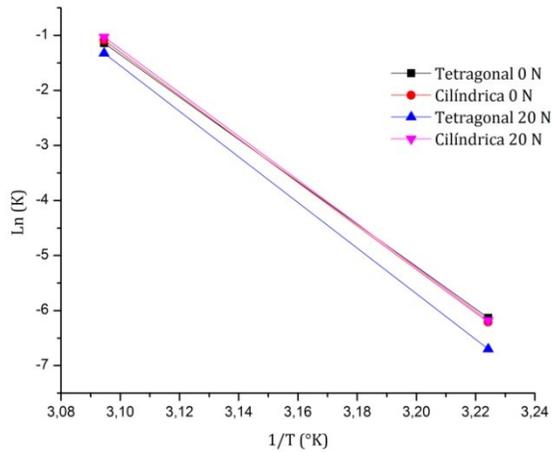
$$k(T) = A * e^{\frac{-Ea}{RT}} \quad (21)$$

Donde:

$k(T)$ : constante cinética (dependiente de la temperatura),  $A$ : factor preexponencial o factor de frecuencia. Indica la frecuencia de las colisiones,  $Ea$ : energía de activación, expresada en J/mol,  $R$ : constante universal de los gases. Su valor es 8,3143 J·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>,  $T$ : temperatura absoluta [K].

La ecuación 24 se reacomoda para ser usada junto con los datos obtenidos en un modelo de regresión lineal (Ecuación 25), del cual se obtiene la información de la **Tabla 5-29**.

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T}\right) \quad (22)$$

**Figura 5-13** Diagrama de Arrhenius de degradación del PLGA moldeado por ALM**Tabla 5-29** Variables de la ecuación de Arrhenius

	<b>Tetragonal 0N</b>	<b>Cilíndrica 0N</b>	<b>Tetragonal 20 N</b>	<b>Cilíndrica 20 N</b>
Energía de activación (Ea)	319895,5	328323,8	344639,8	330134,1
Factor pre-exponencial (A)	1,62669E+51	3,95811E+52	1,35529E+55	8,22466E+52

Se observa que la energía de activación de todos los tratamientos fue similar, excepto por la probeta tetragonal a 20N. Así mismo, presenta valores superiores a reportados por Deng et al., 2005 teniendo en cuenta que se usó PGLA en proporción de 90:10.

Las cinéticas de degradación analizadas no necesariamente deben ser las mismas si se hacen a partir de otros parámetros de medición como la pérdida de peso molecular o el cambio en el esfuerzo mecánico. (Göpferich, 1996).



## 6. Análisis general de los resultados

La manufactura aditiva por capas fue una técnica versátil a la hora de fabricar geometrías complejas, presentó ventajas como uso eficiente de la materia prima y garantizó una fabricación no contaminada (**Tabla 5-5**). Sin embargo, se requiere tener sistemas de regulación de la temperatura más precisos que eviten que la viscosidad del material cambie mientras está siendo dispensado, ya que el rango de temperatura óptimo de fusión es pequeño y una reducción en este impide que salga polímero fundido y puede dañar el extrusor; y un incremento en dicha temperatura daña el material e impide que se forme la estructura 3D reticulada. Lo anterior pudo causar la desviación estándar del lote producido para esta investigación. De igual manera al producirse estructuras anisotrópicas, el sistema es más propenso a tener fallas estructurales que si fuera un sólido fabricado por inyección. Sumando a lo anterior la degradación en masa hizo que la estructura fuera más propensa a cambios dramáticos en las propiedades mecánicas (Lin y Anseth, 2009).

La geometría afecta las variables de salida del diseño experimental, pero de manera conjunta con el tiempo. Esta investigación mostró descriptivamente como la estructura cilíndrica tuvo más cambios en comparación con la estructura tetragonal. Sin embargo, la anterior información requiere más investigación.

En cuanto a la carga a compresión, esta afectó significativamente el peso perdido debido a que algunas probetas se fragmentaron más rápido con la carga máxima, sin que esto necesariamente implicara diferencias notorias en la degradación como se ve en las cinéticas de degradación. De igual manera al fragmentarse la probeta, la cinética y la velocidad de degradación cambian ya que el área de contacto con el medio ha cambiado. Esto explicaría el incremento en el porcentaje de diferencia en el balance de masas como se observó en las últimas semanas.

No obstante, si se tiene en cuenta la interacción entre carga y tiempo su efecto es significativo, se observaron diferencias en los niveles de carga, que a su vez cambiaron con el tiempo. Lo anterior no aplicó para la carga a 10 N, la cual actuó como una barrera impidiendo que la probeta interactuara con el medio de la misma forma en que el medio lo hizo con las demás probetas durante el ensayo y por consiguiente no causó cambios notorios en las variables de salida. Li et al, 2010 reportan que la carga por sí sola no produce degradación.

El mecanismo de degradación observado durante el ensayo a 37 °C fue en masa (*bulk*), ya que las probetas a lo largo del tiempo sin importar su geometría o fuerza aplicada conservaron estados y tendencias de las variables de salida hasta la semana 8, como lo observaron también Ibrahim, Koolen, Kim, Perrone, Kaplan, y Lin, 2015. Makadia y Siegel, 2011 reportan una gráfica de comportamiento del PLGA 85:15 que es muy similar al que se observó en los dispositivos de prueba de esta investigación, donde el estallido se dio entre los días 40 y 60 con una pérdida de polímero de un 20 a 40%. Por otro lado, Hung et al., en el 2003 observaron en un cultivo de agarosa que los condrocitos en la semana 8 ya tenían propiedades similares al cartílago.

Los cambios macroscópicos observados durante este trabajo evidencian que el material sin importar la forma y la carga se fusionó y cerró los poros; adicionalmente se observó que el material cambió su color, de transparente a blanco como lo reporta Santoveña, Álvarez-Lorenzo, Concheiro, Llabrés, Fariña 2004; esto también indica que el material aumento su porcentaje de cristalización. El anterior comportamiento no se observó en las probetas sujetas a 10 N, que permanecieron transparentes por más tiempo.

Referente al mecanismo de degradación de las probetas *in vitro* ante condiciones de carga mecánica específicas se observó que es igual en todas las probetas sin importar la carga o la geometría y se da erosión en masa, el estallido se presentó en los mismos tiempos.

Por otra parte, el efecto de la carga en la cinética de degradación de las probetas con geometría tetragonal y cilíndrica a 37 °C reportó velocidades de degradación diferentes de acuerdo a la carga aplicada, la velocidad es mayor para la carga a 0N y decrece de acuerdo al aumento de la carga, esto implica que las probetas tetragonales se degradaron menos a medida que

incrementaba la carga porque estas cargas limitaban el proceso, en cambio las probetas cilíndricas se degradaron más rápido con las cargas a 0 y 20N. A 10 N se degradó más lento en comparación con las otras dos cargas, pero no se frenó el proceso. Esta cinética es de orden cero.

El efecto de la carga en la cinética de degradación acelerada mostró que en las probetas tetragonales, la velocidad se incrementó tanto en las probetas con carga a 0N como a 20N debido al incremento de la temperatura de operación, pero para las probetas a 20N la velocidad fue menor, es decir, mantuvo la tendencia que se presentó en el ensayo de 37 °C. Por otro lado, el comportamiento de las probetas cilíndricas presentó una velocidad mayor con respecto a las tetragonales, pero incrementó con la carga a 20N indicando que en este caso la carga no impedía la degradación del sistema, sino que por el contrario la promovía. Para este caso las probetas experimentaron una cinética de orden cero.

Por último, el modelo de Hopfenberg presentó buenos ajustes para los tratamientos examinados en los ensayos de degradación en tiempo real y acelerado. La probeta cilíndrica a 20N en el ensayo acelerado no presentó un ajuste tan bueno como en los otros tratamientos, esto pudo deberse a que desde el día 7, esta probeta desprendió partículas y para el día 16 se había desintegrado por completo, entonces en el medio había varios sólidos degradándose y por tal motivo la cinética del sistema cambió.

En cuanto a la energía de activación para las probetas cilíndricas y tetragonales a 0 y 20 N se observó que son iguales excepto para la probeta tetragonal a 20 N que tiene una energía de activación mayor, esto indica que requirió más energía para iniciar el proceso de degradación.

Las probetas fabricadas mostraron la primera y parte de la segunda fase de degradación del PLGA que menciona Makadia y Siegel en el 2011, independientemente de la geometría o la carga aplicada. La primera fase se caracterizó por pérdida mínima o nula de masa de las probetas; y la segunda se caracterizó por un deterioro en las probetas y su consecuente pérdida de masa. Para la semana 8 la mayor parte de las probetas estaban visiblemente en buen estado, pero su función mecánica se había reducido antes de notarse una pérdida significativa en la masa, la cual se dio al final de la primera fase; lo anterior lo reportaron Maurus y Kaeding, 2004 quienes mencionaron que algunos polímeros pierden resistencia en

las semanas 5 a la 8 aproximadamente y pierden la masa por completo de 6 a 12 meses. En la investigación de Álvarez y Mantilla, 2009 se reporta que durante la primera fase se presenta erosión superficial y está directamente enfocada a la parte amorfa del material, y durante la segunda fase ocurre la erosión en masa que se da en la parte cristalina del material.

En el trabajo hecho por Hutmacher en el 2000, reportó que en 3 semanas se puede dar el crecimiento de tejido prematuro en un ambiente dinámico y que en 9 semanas ya se observaba crecimiento de tejido óseo en un ambiente fisiológico (bioreactor), luego el comportamiento del dispositivo de prueba fabricado podría adecuarse para hacer ensayos tanto en ambientes dinámicos como fisiológicos porque dentro de esas 9 semanas se da parte de la degradación, pérdida de masa, absorción y metabolización de un implante óseo.

En el trabajo de Lehtonen et al., 2013, se encuentra que para cirugías pediátricas y maxilofaciales se debe garantizar una estabilidad del implante de 4 a 6 semanas (Resistencia al corte, flexión y tensión) y para artroscopía 6 a 12 semanas (resistencia a la torsión y al cizallamiento) lo cual indica que los dispositivos trabajados en esta investigación se podrían adecuar para soportar crecimiento de tejido en estas aplicaciones médicas, recordando que el dispositivo de prueba no está diseñado para trabajar cargas de fijación ósea.

La carga de 10 N podría usarse como retardante cuando se observe que hubo una aceleración en la degradación del implante no deseada y así evitar una concentración de los productos de degradación en la zona de interés evitando toxicidad o inflamación.

## 7. Conclusiones

- El mecanismo de degradación a 37 °C y a 50 °C se dio por erosión en masa (*Bulk*) para las probetas fabricadas en esta investigación, indistintamente del tratamiento analizado. Sin embargo, los tiempos de estallido fueron diferentes de acuerdo a la carga aplicada, la geometría no afectó el mecanismo ni los tiempos de estallido.
- La carga afecta la cinética y mecanismo de degradación, pero en este estudio no se encontró una relación lineal al incrementar la magnitud de la carga.
- El modelo de Hopfenberg presentó buen ajuste con los datos adquiridos en esta investigación, pero no tiene en cuenta que sus parámetros varían con el tiempo al ser la degradación un proceso dinámico.
- La validación del método de espectrofotometría UV-VIS permitió caracterizar las dos primeras fases de degradación del PLGA, sin importar que la primera no generara productos en forma de monómeros y en la segunda si lo hiciera.

## **8. Perspectivas de investigación y recomendaciones**

Teniendo en cuenta los resultados de esta investigación se recomienda:

- Construir un modelo que involucre la energía mecánica aplicada.
- Proponer otros entramados para mejorar la estabilidad mecánica del implante.
- Implementar la esterilización de dispositivos con estructura trabecular y analizar los efectos que tendría el método de esterilización sobre estos dispositivos.

## Anexo 1: Concentraciones de la curva de calibración

Nombre	Volumen Alícuota (ml)	Volumen Aforo (ml)	Concentración (mg/ml)	$\lambda$	Absorbancia	Promedio
Q	--	--	2	214	2	2,000
A	1	25	0,08	207	0,143	0,150
				207	0,149	
				207	0,157	
B	2	25	0,16	207	0,203	0,213
				207	0,217	
				207	0,22	
C	3	25	0,24	207	0,364	0,373
				207	0,377	
				207	0,378	
D	4	25	0,32	207	0,468	0,476
				207	0,475	
				207	0,484	
E	5	25	0,40	207	0,573	0,582
				207	0,587	
				207	0,587	
F	6	25	0,48	207	0,700	0,712
				207	0,714	
				207	0,721	
G	13	50	0,52	207	0,833	0,826
				207	0,821	
				207	0,823	



## Anexo 2: Propiedades del medio durante el ensayo de degradación

PROBETA	MEDIO		
	pH	Temperatura de lectura (°C)	Conductividad electrolítica (mS/cm)
1	7,46	18,6	127,9
2	7,46	18,5	180,0
3	7,45	18,4	134,9
4	7,43	20,7	122,6
5	7,45	19,6	122,5
6	7,46	20,2	120,3
7	7,48	22,1	123,8
8	7,47	21,4	126,2
9	7,48	21,8	120,2
10	7,48	18,2	120,0
11	7,44	18,0	124,1
12	7,48	17,9	121,9
13	7,45	18,9	120,4
14	7,47	19,0	119,8
15	7,40	19,2	116,3
16	7,49	19,2	107,4
17	7,42	19,2	120,8
18	7,40	19,2	120,8
19	7,46	20,0	115,7
20	7,42	19,6	118,4
21	7,40	20,2	120,6
22	7,42	18,5	124,5
23	7,43	18,7	125,4
24	7,46	19,2	129,2
25	7,43	18,7	120,2
26	7,36	18,9	106,5
27	7,35	19,3	104,3
28	7,42	18,8	124,4
29	7,37	18,5	123,5
30	7,32	18,7	86,2

### Anexo 3: Polímero liberado en condiciones aceleradas

Día	Probeta	Absorbancia	Concentración liberada (mg PLGA/ml de PBS)	Cantidad de polímero liberada en 20 ml (mg)
1	M. Prima	0,219	0,149	2,979
	Cilíndrica 0 N	0,227	0,154	3,083
	Tetragonal 0 N	0,278	0,186	3,711
	Cilíndrica 20 N	0,279	0,186	3,724
	Tetragonal 20 N	0,237	0,160	3,204
2	M. Prima	0,203	0,139	2,784
	Cilíndrica 0 N	0,298	0,198	3,961
	Tetragonal 0 N	0,228	0,155	3,096
	Cilíndrica 20 N	0,261	0,175	5,261
	Tetragonal 20 N	0,225	0,153	3,058
3	M. Prima	0,189	0,130	2,609
	Cilíndrica 0 N	0,356	0,234	4,684
	Tetragonal 0 N	0,212	0,145	2,896
	Cilíndrica 20 N	0,213	0,145	2,904
	Tetragonal 20 N	0,164	0,115	2,297
4	M. Prima	0,110	0,081	1,615
	Cilíndrica 0 N	0,422	0,276	5,516
	Tetragonal 0 N	0,201	0,138	2,750
	Cilíndrica 20 N	0,219	0,149	2,983
	Tetragonal 20 N	0,179	0,124	2,476
5	M. Prima	0,577	0,372	44,650
	Cilíndrica 0 N	0,355	0,234	4,672

	Tetragonal 0 N	0,278	0,186	3,720
	Cilíndrica 20 N	0,325	0,215	4,298
	Tetragonal 20 N	0,365	0,240	4,797
	M. Prima	0,134	0,096	1,919
7	Cilíndrica 0 N	0,543	0,351	7,022
	Tetragonal 0 N	0,548	0,354	7,088
	Cilíndrica 20 N	0,662	0,425	8,506
	Tetragonal 20 N	0,370	0,243	4,859
	M. Prima	0,131	0,094	1,885
	Cilíndrica 0 N	0,539	0,349	6,972
8	Tetragonal 0 N	0,582	0,375	7,508
	Cilíndrica 20 N	0,561	0,362	7,246
	Tetragonal 20 N	0,708	0,454	9,080
	M. Prima	0,196	0,134	2,688
	Cilíndrica 0 N	0,480	0,312	6,240
9	Tetragonal 0 N	0,520	0,337	6,735
	Cilíndrica 20 N	0,504	0,327	6,535
	Tetragonal 20 N	0,374	0,246	4,913
	M. Prima	0,379	0,249	4,971
	Cilíndrica 0 N	0,441	0,287	5,749
10	Tetragonal 0 N	0,657	0,422	8,448
	Cilíndrica 20 N	0,318	0,211	4,214
	Tetragonal 20 N	0,194	0,133	2,667
	M. Prima	0,353	0,232	4,647
	Cilíndrica 0 N	0,407	0,266	5,321
11	Tetragonal 0 N	0,416	0,272	5,437
	Cilíndrica 20 N	0,569	0,367	7,342
	Tetragonal 20 N	0,495	0,321	6,427
	M. Prima	0,113	0,083	1,661
	Cilíndrica 0 N	0,258	0,173	3,462
12	Tetragonal 0 N	0,310	0,206	4,119
	Cilíndrica 20 N	0,434	0,283	5,666
	Tetragonal 20 N	0,599	0,386	7,716
	M. Prima	0,502	0,325	6,506
	Cilíndrica 0 N	0,435	0,284	5,670
14	Tetragonal 0 N	0,527	0,341	6,822
	Cilíndrica 20 N	0,338	0,223	4,464
	Tetragonal 20 N	0,393	0,258	5,154
	M. Prima	0,275	0,184	3,682
	Cilíndrica 0 N	0,240	0,162	3,245
15	Tetragonal 0 N	0,284	0,189	3,786
	Cilíndrica 20 N	0,389	0,255	5,100

	Tetragonal 20 N	0,225	0,152	3,050
	M. Prima	0,458	0,298	5,965
	Cilíndrica 0 N	0,239	0,161	3,229
16	Tetragonal 0 N	0,619	0,398	7,970
	Cilíndrica 20 N	0,235	0,159	3,179
	Tetragonal 20 N	0,207	0,142	2,834
	M. Prima	0,491	0,319	6,377
	Cilíndrica 0 N	0,220	0,149	2,988
17	Tetragonal 0 N	0,256	0,172	3,437
	Cilíndrica 20 N	0,380	0,250	4,992
	Tetragonal 20 N	0,455	0,296	5,924
	M. Prima	0,573	0,370	7,396
	Cilíndrica 0 N	0,244	0,165	3,295
18	Tetragonal 0 N	0,318	0,211	4,210
	Cilíndrica 20 N	0,322	0,213	4,260
	Tetragonal 20 N	0,449	0,293	5,853
	M. Prima	0,327	0,216	4,327
	Cilíndrica 0 N	0,163	0,114	2,281
19	Tetragonal 0 N	0,241	0,163	3,258
	Cilíndrica 20 N	0,256	0,172	3,437
	Tetragonal 20 N	0,442	0,288	5,757
	M. Prima	0,460	0,300	5,990
	Cilíndrica 0 N	0,199	0,136	2,726
21	Tetragonal 0 N	0,325	0,215	4,298
	Cilíndrica 20 N	0,188	0,129	2,588
	Tetragonal 20 N	0,397	0,260	5,200
	M. Prima	0,201	0,138	2,750
	Cilíndrica 0 N	0,270	0,181	3,611
22	Tetragonal 0 N	0,395	0,259	5,179
	Cilíndrica 20 N	0,216	0,147	2,942
	Tetragonal 20 N	0,325	0,215	4,306
	M. Prima	0,387	0,254	5,079
	Cilíndrica 0 N	0,274	0,183	3,670
23	Tetragonal 0 N	0,304	0,202	4,040
	Cilíndrica 20 N	0,203	0,139	2,784
	Tetragonal 20 N	0,376	0,247	4,942
	M. Prima	0,329	0,218	4,356
	Cilíndrica 0 N	0,265	0,177	3,549
24	Tetragonal 0 N	0,288	0,192	3,836
	Cilíndrica 20 N	0,215	0,146	2,925
	Tetragonal 20 N	0,337	0,222	4,447
25	M. Prima	0,271	0,181	3,624

---

	Cilíndrica 0 N	0,275	0,184	3,674
	Tetragonal 0 N	0,306	0,203	4,065
	Cilíndrica 20 N	0,211	0,144	2,875
	Tetragonal 20 N	0,330	0,218	4,360
	M. Prima	0,286	0,191	3,815
	Cilíndrica 0 N	0,314	0,208	4,165
26	Tetragonal 0 N	0,294	0,196	3,915
	Cilíndrica 20 N	0,260	0,175	3,495
	Tetragonal 20 N	0,327	0,217	4,331

---



## Bibliografía

- Amirkhani, S., Bagheri, R., & Zehtab Yazdi, A. (2012). Effect of pore geometry and loading direction on deformation mechanism of rapid prototyped scaffolds. *Acta Materialia*, 60(6–7), 2778–2789. <http://doi.org/10.1016/j.actamat.2012.01.044>
- Anderson, J. M., & Shive, M. S. (2012). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 72–82. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.004>
- ASTM-D7426. (2013). Standard Test Method for Assignment of the DSC Procedure for Determining Tg of a Polymer or an Elastomeric Compound. *ASTM International*, i(Reapproved 2013), 1–4. <http://doi.org/10.1520/D7426-08R13.2>
- Bailey, C. a, Kuiper, J. H., & Kelly, C. P. (2006). Article in Press Biomechanical Evaluation of a New Composite Bioresorbable Screw. *Hand Surgery*, 3(1998), 3–7.
- Balestro, J. C., Young, A., Maccioni, C., & Walch, G. (2015). Graft osteolysis and recurrent instability after the Latarjet procedure performed with bioabsorbable screw fixation. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 24(5), 711–718. <http://doi.org/10.1016/j.jse.2014.07.014>
- Bourell, D., Kruth, J. P., Leu, M., Levy, G., Rosen, D., Beese, A. M., & Clare, A. (2017). Materials for additive manufacturing. *CIRP Annals - Manufacturing Technology*. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cirp.2017.05.009>
- Burdick, A., J., & Mauck, L., R. (2011). *Biomaterials for Tissue Engineering Applications*.
- Burkersroda, F. Von, Schedl, L., & G??pferich, A. (2002). Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*, 23(21), 4221–4231. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00170-9](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00170-9)
- Chen, V. J., & Ma, P. X. (2006). The effect of surface area on the degradation rate of nano-fibrous poly(l-lactic acid) foams. *Biomaterials*, 27(20), 3708–3715. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.020>
- CORREDOR, N. A. A. M. J. F. M. (2009). EVOLUCIÓN DE LA CRISTALINIDAD DE COPOLIMEROS DE PLGA (70:30 Y 50:50) MEZCLADOS. *PhD Proposal*, 1. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Deng, M., Chen, G., Burkley, D., Zhou, J., Jamiolkowski, D., Xu, Y., & Vetrecin, R. (2008). A study on in vitro degradation behavior of a poly(glycolide-co-l-lactide) monofilament. *Acta*

- Biomaterialia*, 4(5), 1382–1391. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.03.011>
- Deng, M., Zhou, J., Chen, G., Burkley, D., Xu, Y., Jamiolkowski, D., & Barbolt, T. (2005). Effect of load and temperature on in vitro degradation of poly(glycolide-co-L-lactide) multifilament braids. *Biomaterials*, 26(20), 4327–4336. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.067>
- Dianney, D., Grimaldo, C., Edgar, J., Orjuela, A., Carmen, O., & Cardozo, A. (2010). Hacia una nueva generación de biomateriales. Primera parte. *Encuentro Nacional de Residentes - Bogotá - Colombia*, 24(3), 168–177. Retrieved from <http://www.sccot.org.co/BancoMedios/Documentos/PDF/haciaunanuevageneracion.pdf>
- Dreher, M. L., Nagaraja, S., Bui, H., & Hong, D. (2014). Characterization of load dependent creep behavior in medically relevant absorbable polymers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 29, 470–479. <http://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.10.005>
- Editor, S., & Iby, T. (2011). *Active Implants and scaffolds for Tissue Regeneration. Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials*. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-32563-2>
- Fan, Y. B., Li, P., Zeng, L., & Huang, X. J. (2008). Effects of mechanical load on the degradation of poly(D,L-lactic acid) foam. *Polymer Degradation and Stability*, 93(3), 677–683. <http://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.12.015>
- Farah, S., Anderson, D. G., & Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 367–392. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.012>
- Felfel, R. (2013). *Manufacture and Characterisation of Bioresorbable Fibre Reinforced Composite Rods and Screws for Bone Fracture Fixation Applications By*, (January).
- Gang, E. H., Ki, C. S., Kim, J. W., Lee, J., Cha, B. G., Lee, K. H., & Park, Y. H. (2012). Highly porous three-dimensional poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microfibrous scaffold prepared by electrospinning method: A comparison study with other PLGA type scaffolds on its biological evaluation. *Fibers and Polymers*, 13(6), 685–691. <http://doi.org/10.1007/s12221-012-0685-8>
- Gasifier, C. M. (2001). Study on the Degradation of Tuyere Coke in, 10(39770878), 2698–2704.
- Göpferich, A. (1996). Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, 17(2), 103–114. [http://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85755-3](http://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85755-3)
- Guo, M., Chu, Z., Yao, J., Feng, W., Wang, Y., Wang, L., & Fan, Y. (2016). The effects of tensile stress on degradation of biodegradable PLGA membranes: A quantitative study. *Polymer Degradation and Stability*, 124, 95–100. <http://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.12.019>

- HOPFENBERG, H. B. (1976). Controlled Release from Erodible Slabs, Cylinders, and Spheres, 26–32.
- Hung, C. T., Mauck, R. L., Wang, C. C. B., Lima, E. G., & Ateshian, G. A. (2004). A paradigm for functional tissue engineering of articular cartilage via applied physiologic deformational loading. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(1), 35–49. <http://doi.org/10.1023/B:ABME.0000007789.99565.42>
- Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21(24), 2529–2543. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00121-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00121-6)
- Ibrahim, A. M. S., Koolen, P. G. L., Kim, K., Perrone, G. S., Kaplan, D. L., & Lin, S. J. (2015). Absorbable Biologically Based Internal Fixation. *Clinical Podiatric Medical Surgery*, 32, 61–72. <http://doi.org/10.1016/j.cpm.2014.09.009>
- Jain, R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21, 2475–2490. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00115-0](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00115-0)
- Julien, J. M., Quantin, J. C., B??n??zet, J. C., Bergeret, A., Lacrampe, M. F., & Krawczak, P. (2015). Chemical foaming extrusion of poly(lactic acid) with chain-extenders: Physical and morphological characterizations. *European Polymer Journal*, 67, 40–49. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.011>
- Konan, S., & Haddad, F. S. (2009). A clinical review of bioabsorbable interference screws and their adverse effects in anterior cruciate ligament reconstruction surgery. *Knee*, 16(1), 6–13. <http://doi.org/10.1016/j.knee.2008.06.001>
- Larra??aga, A., Aldazabal, P., Martin, F. J., & Sarasua, J. R. (2014). Hydrolytic degradation and bioactivity of lactide and caprolactone based sponge-like scaffolds loaded with bioactive glass particles. *Polymer Degradation and Stability*, 110, 121–128. <http://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.08.021>
- Lehtonen, T. J., Tuominen, J. U., & Hiekkanen, E. (2013). Resorbable composites with bioresorbable glass fibers for load-bearing applications. in vitro degradation and degradation mechanism. *Acta Biomaterialia*, 9(1), 4868–4877. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.052>
- Li, P., Feng, X., Jia, X., & Fan, Y. (2010). Influences of tensile load on in vitro degradation of an electrospun poly(L-lactide-co-glycolide) scaffold. *Acta Biomaterialia*, 6(8), 2991–2996. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.023>
- Lin, C.-C., & Anseth, K. S. (2013). *The Biodegradation of Biodegradable Polymeric Biomaterials. Biomaterials Science* (Third Edit). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00061-9>
- López Gasco, P. (2011). *Preparación, Caracterización Y Evaluación Biológica De Nanopartículas Poliméricas Para La Liberación Controlada De Paclitaxel*.
- Maderuelo, C., Zarzuelo, A., & Lanao, J. M. (2011). Critical factors in the release of drugs from

- sustained release hydrophilic matrices. *Journal of Controlled Release*, 154(1), 2–19.  
<http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.04.002>
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), 1377–1397.  
<http://doi.org/10.3390/polym3031377>
- Maurus, P. B., & Kaeding, C. C. (2004). Bioabsorbable implant material review. *Operative Techniques in Sports Medicine*, 12(3), 158–160.  
<http://doi.org/10.1053/j.otsm.2004.07.015>
- McConville, C., Tawari, P., & Wang, W. (2015). Hot melt extruded and injection moulded disulfiram-loaded PLGA millirods for the treatment of glioblastoma multiforme via stereotactic injection. *International Journal of Pharmaceutics*, 494(1), 73–82.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.072>
- Mehboob, H., & Chang, S.-H. (2014). Application of composites to orthopedic prostheses for effective bone healing: A review. *Composite Structures*, 118, 328–341.  
<http://doi.org/10.1016/j.compstruct.2014.07.052>
- Moroni, L. (2006). *A Mechanistic Approach to Design Smart Scaffolds for Tissue Engineering. Tissue Engineering*.
- Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 32(8–9), 762–798.  
<http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>
- Okamoto, M., & John, B. (2013). Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. *Progress in Polymer Science*, 38(10–11), 1487–1503.  
<http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.06.001>
- Oliveira, A. R., Caland, L. B., Oliveira, E. G., Egito, E. S. T., Pedrosa, M. F. F., & Silva, A. A. (2015). HPLC-DAD and UV-vis spectrophotometric methods for methotrexate assay in different biodegradable Microparticles. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(4), 649–659.  
<http://doi.org/10.5935/0103-5053.20150022>
- Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A. M., & Chiellini, E. (2010). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Topical Issue on Biomaterials*, 35(4), 403–440. [http://doi.org/DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006](http://doi.org/DOI:10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006)
- Rojas Cortés, M. G., Margarita, B., Díaz, V., Jairo, Y., & Perilla, E. (2008). Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico Biopolymers as materials for developing products in pharmaceutical applications and biomedical uses. *Abril De*, 28(1), 57–71.
- Sabir, M. I., Xu, X., & Li, L. (2009). A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science*, 44(21), 5713–5724.  
<http://doi.org/10.1007/s10853-009-3770-7>
- Santoveña, A., Álvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Llabrés, M., & Fariña, J. B. (2004).

- Rheological properties of PLGA film-based implants: Correlation with polymer degradation and SPf66 antimalaric synthetic peptide release. *Biomaterials*, 25(5), 925–931. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00592-1](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00592-1)
- Shaikh, H. K., Kshirsagar, R. V., & Patil, S. G. (2015). Mathematical Models for Drug Release Characterization : a Review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(4), 324–338.
- Shen, J., & Burgess, D. J. (2012). Accelerated in vitro release testing of implantable PLGA microsphere/PVA hydrogel composite coatings. *International Journal of Pharmaceutics*, 422(1–2), 341–348. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.10.020>
- Silva-Buzanello, R. A. Da, Ferro, A. C., Bona, E., Cardozo-Filho, L., Araújo, P. H. H. De, Leimann, F. V., & Gonçalves, O. H. (2015). Validation of an Ultraviolet-visible (UV-Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly(l-lactic acid) nanoparticles. *Food Chemistry*, 172, 99–104. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.016>
- Singh, S., & Ramakrishna, S. (2017). Biomedical applications of additive manufacturing: present and future. *Current Opinion in Biomedical Engineering*. <http://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.05.006>
- Singh, S., Ramakrishna, S., & Singh, R. (2017). Material issues in additive manufacturing: A review. *Journal of Manufacturing Processes*, 25, 185–200. <http://doi.org/10.1016/j.jmapro.2016.11.006>
- Sobral, J. M., Caridade, S. G., Sousa, R. A., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2011). Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. *Acta Biomaterialia*, 7(3), 1009–1018. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.003>
- Stevanovi, M., & Uskokovi, D. (2009). Poly ( lactide-co-glycolide ) -based Micro and Nanoparticles for the Controlled Drug Delivery of Vitamins. *Current Nanoscience*, 5(1), 1–15. <http://doi.org/10.2174/157341309787314566>
- Sultana, N. (2013). *Biodegradable Polymer- Based Scaffolds for Tissue Engineering*. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-34802-0>
- Teodora, A., Rios, C., Camilla, B., Cardoso, O., Elisa, M., Ribeiro, S., ... Freitas, S. (2015). Synthesis , Characterization , and Study of PLGA Copolymer in Vitro Degradation, (January), 8–19.
- Varios. (2013). *Degradation of implant materials. Degradation of implant materials* (Vol. 1). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Wintermantel, E., & Ha, S.-W. (2009). *Medizintechnik: Life Science Engineering. Interdisziplinarität ...*, 2570. <http://doi.org/10.1007/978-3-540-74925-7>
- Wu, L., & Ding, J. (2004). In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 25(27), 5821–30. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.038>

- Yang, F., Cui, W., Xiong, Z., Liu, L., Bei, J., & Wang, S. (2006). Poly(l,l-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. *Polymer Degradation and Stability*, 91(12), 3065–3073. <http://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.08.008>
- Yang, F., Wang, J., Hou, J., Guo, H., & Liu, C. (2013). Bone regeneration using cell-mediated responsive degradable PEG-based scaffolds incorporating with rhBMP-2. *Biomaterials*, 34(5), 1514–1528. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.058>
- Yang, Y., Zhao, Y., Tang, G., Li, H., Yuan, X., & Fan, Y. (2008). In vitro degradation of porous poly(l-lactide-co-glycolide)/??-tricalcium phosphate (PLGA/??-TCP) scaffolds under dynamic and static conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 93(10), 1838–1845. <http://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.07.007>
- Yildirimer, L., & Seifalian, A. M. (2014). Three-dimensional biomaterial degradation - Material choice, design and extrinsic factor considerations. *Biotechnology Advances*, 32(5), 984–999. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.014>
- Zolnik, B. S., & Burgess, D. J. (2007). Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *Journal of Controlled Release*, 122(3), 338–344. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.05.034>
- Zolnik, B. S., Leary, P. E., & Burgess, D. J. (2006). Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, 112(3), 293–300. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.02.015>