



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**DISEÑO DE UNA MEMBRANA BIODEGRADABLE PARA LA  
LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICO EN BASE DE UN MODELO  
FENOMENOLÓGICO**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN  
CIENCIAS DE LA INGENIERÍA, MENCIÓN QUÍMICA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

**XIMENA PAZ BARRIOS PIZARRO**

PROFESOR GUÍA:  
ZIOMARA P. GERDTZEN HAKIM

PROFESOR CO-GUÍA:  
J. CRISTIAN SALGADO HERRERA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
A. LEANDRO HERRERA ZEPPELIN  
MEHRDAD YAZDANI-PEDRAM ZOBEIRI

SANTIAGO DE CHILE  
ABRIL 2015

RESUMEN DE LA MEMORIA  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: XIMENA PAZ BARRIOS PIZARRO  
FECHA: ABRIL 2015  
PROF. GUÍA: ZIOMARA GERTZDEN HAKIM

## DISEÑO DE UNA MEMBRANA BIODEGRADABLE PARA LA LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICO EN BASE DE UN MODELO FENOMENOLÓGICO

Hace más de 100 años los dispositivos de administración de fármacos (o *Drug Delivery Systems*, DDS) han comenzado a ser desplazados por un nuevo tipo de sistemas llamados de liberación controlada o *Controlled Release Systems* (CRS), los cuales pueden generar dos tipos de control de la liberación del fármaco: temporal y espacial.

Bajo esta idea se desarrolla el uso de membranas de ácido poliláctico (PLA) de 1 cm x 1 cm cargadas con ampicilina para la liberación controlada, prolongada y localizada del antibiótico, con el fin de tratar la Otitis Media Aguda (OMA).

Por otro lado, se ha visto que a etapa de diseño ha adquirido una gran importancia en este tipo de dispositivos por lo que surge el interés de desarrollar un trabajo que incorpore este paso. Esto con el fin de generar un dispositivo óptimo en su funcionalidad y que sean capaces de satisfacer las necesidades de los pacientes que lo utilicen.

De este modo se define como objetivo general de este trabajo el diseño de una membrana biodegradable de PLA que permita encapsular y luego liberar antibiótico en forma controlada y prolongada para el tratamiento de infecciones recurrentes como es el caso de la OMA.

El desarrollo de este proyecto consistió principalmente en 2 etapas: en una primera etapa de modelamiento matemático se definieron los fenómenos de liberación relevantes en el sistema, las ecuaciones matemáticas que describen dichos fenómenos, su implementación en un *software* de modelamiento y el posterior ajuste de los parámetros del modelo. En una segunda fase experimental, se sintetizaron membranas con el fin de obtener nuevos datos de liberación de ampicilina *in vitro* que permitan ampliar el rango de los parámetros de diseño a estudiar y que fueran útiles en el ajuste de parámetros del modelo en base a datos experimentales.

Como principal resultado del diseño del sistema a través del modelo, se obtuvo que el polímero PDL04 era el mejor para la síntesis de este dispositivo, y que una membrana de espesor 1 [mm] y una concentración inicial de  $0,1653 \text{ gr/cm}^3$  permitirían obtener un perfil constante y de una concentración deseada para el tratamiento del OMA.

*A mis padres, Rosa y Adrian,  
y a mis hermanos, Jani y Chequelo,  
que son lo único que amo en esta vida.  
Aunque no lo crean.*

# Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi profesora guía, Ziomara, de quien admiro su pragmatismo y claridad de pensamiento, y cuya guía y consejos siempre fueron tranquilizadores en momentos de confusión. También quisiera agradecer a mi profesor co-guía, Salgado, que también siempre fue una ayuda, especialmente en lo relacionado con el modelamiento, y que siempre tuvo disposición en resolver mis dudas.

Por otro lado, mil gracias a mis compañeros de generación. Me encanta que en nuestra diversidad seamos tan unidos. En verdad creo que todos ustedes serán capaces de lograr todos sus sueños y aspiraciones, así que no me queda nada más que pedir que no se pierda el contacto. Mención especial al Jorge, quien siempre encontró la forma de darme ánimos a pesar de que estaba trabajando, y a Felipe, nuestro profe jefe, quien es un ejemplo de persona y profesional que siempre encontró un espacio en su apretada agenda para ayudarme y conversar conmigo de la vida. También quisiera agradecer a la Miriam, de quien me aproveche de su habilidad especial de redacción y corrección, a la Carla, COMSOL-compañera, y a la Andrea, a quien conocí en el primer semestre, terminando estudiando la misma carrera, y compartiendo todos estos años de universidad

También tengo que nombrar a la gente que me acompañó en el CeBIB. Nancy y su infinita paciencia para ayudarme en el laboratorio. Carmen, Gonzalo y JM, quienes me dieron ánimos y me ayudaron con sus consejos, y que hicieron que la estancia en el laboratorio fuera mucho más grata, y con sushi. En especial me gustaría darle muchas gracias al Juan, quien fue la persona que más me apoyó en este proceso de tesis y que muchas veces me chicoteó para que trabajara y sacara esto adelante, además de ser uno de los mejores amigos que he tenido y una de las personas que mejor me conoce. Quién lo diría...

Tengo que mencionar a los distintos grupos de tesis en los que disfruté participar, ya que de ellos fui aprendiendo de los distintos temas desarrollados por sus integrantes, además de conocer cuales eran sus intereses profesionales y motivaciones. Por otro lado, fueron una gran fuente de apoyo, gracias a la convergencia de los distintos puntos de vista que ocurre en estos grupos.

Y por último, pero no menos importante, quiero agradecer a quienes está dedicada esta memoria-tesis. A mis padres, sé que gracias a ellos y a su sacrificio yo tuve esta oportunidad y estoy aquí ahora. Y a mis hermanos, que terminaron siendo mis *roommates* por estos ¿6, 7 años?, gracias por estar ahí y compartir conmigo, lo que nos permitió la universidad.

# Tabla de contenido

Índice de tablas	vi
Índice de ilustraciones	vii
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes Generales . . . . .	1
1.2. Antecedentes del Proyecto . . . . .	3
1.3. Descripción del proyecto y justificación . . . . .	4
<b>2. Marco Teórico</b>	<b>5</b>
2.1. Otitis Media Aguda . . . . .	5
2.1.1. Ampicilina . . . . .	6
2.2. Ácido Poli-Láctico y su aplicación como DDS . . . . .	9
2.2.1. Síntesis de ácido poliláctico . . . . .	9
2.2.2. Biodegradación de ácido poliláctico . . . . .	10
2.2.3. Erosión de un sistema de ácido poliláctico . . . . .	12
2.3. Mecanismos de liberación de fármacos . . . . .	13
2.3.1. Difusión . . . . .	13
2.3.2. Liberación Explosiva . . . . .	15
2.4. Modelamiento matemático de CRS . . . . .	16
2.5. Objetivos . . . . .	19
2.5.1. Objetivos Generales . . . . .	19
2.5.2. Objetivos Específicos . . . . .	19
<b>3. Metodología</b>	<b>20</b>
3.1. Metodología General . . . . .	20
3.2. Materiales y equipos . . . . .	21
3.3. Metodología experimental . . . . .	23
3.3.1. Evaluación de degradación de ampicilina en presencia de bacterias . . . . .	23
3.3.2. Preparación de <i>buffer</i> fosfato . . . . .	24
3.3.3. Uso y almacenamiento de PLA . . . . .	24
3.3.4. Síntesis de membrana de PLA (PDL04) cargadas con ampicilina . . . . .	24
3.3.5. Síntesis de membrana de PLA (PDL02) cargadas con ampicilina . . . . .	25
3.3.6. Experiencia de liberación de ampicilina . . . . .	25
3.3.7. Cuantificación de las muestras experimentales . . . . .	25
3.4. Metodología de modelamiento . . . . .	27
3.4.1. Comprender el sistema . . . . .	27

3.4.2.	Identificar la fenomenología . . . . .	27
3.4.3.	Seleccionar los fenómenos a considerar en la formulación del modelo . . . . .	27
3.4.4.	Representar los fenómenos mediante ecuaciones matemáticas . . . . .	28
3.4.5.	Formulación del modelo . . . . .	28
3.4.6.	Ajuste de parámetros . . . . .	28
3.4.7.	Diseño óptimo . . . . .	28
<b>4.</b>	<b>Resultados y Discusiones</b>	<b>29</b>
4.1.	Resultados Experimentales . . . . .	29
4.1.1.	Síntesis de membranas . . . . .	29
4.1.2.	Curva de calibración . . . . .	31
4.1.3.	Degradación de ampicilina en presencia de bacterias . . . . .	32
4.1.4.	Liberación <i>in vitro</i> de ampicilina . . . . .	33
4.2.	Resultados de Modelamiento . . . . .	39
4.2.1.	Fenómenos identificados y seleccionados para la formulación del modelo . . . . .	39
4.2.2.	Formulación del modelo y ajuste de parámetros . . . . .	40
4.2.3.	Diseño del dispositivo . . . . .	49
	<b>Conclusiones</b>	<b>51</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>55</b>
	<b>Anexos</b>	<b>I</b>
	<b>A. Protocolos Experimentales</b>	<b>II</b>
A.1.	Evaluación de la degradación de la ampicilina en solución en presencia de bacterias . . . . .	II
A.2.	Preparación de <i>buffer</i> fosfato 0,01 M pH 7 . . . . .	III
A.3.	Uso y almacenamiento de PLA . . . . .	III
A.4.	Síntesis de las membranas de PLA (PDL04) cargadas con ampicilina . . . . .	IV
A.5.	Síntesis de las membranas de PLA (PDL02) cargadas con ampicilina . . . . .	V
A.6.	Liberación <i>in vitro</i> de ampicilina desde membranas de 0,1 mm . . . . .	VI
A.7.	Preparación de las muestras y operación del equipo HPLC . . . . .	XII
	<b>B. Ejemplo de cálculo para la cuantificación de ampicilina en una muestra experimental</b>	<b>XV</b>
	<b>C. Datos experimentales</b>	<b>XVII</b>
	<b>D. Determinación de la distribución de la concentración de ampicilina en la matriz polimérica</b>	<b>XXV</b>
	<b>E. Reporte de COMSOL del modelo</b>	<b>XXVI</b>

# Índice de tablas

2.1. Tratamiento a base de antibiótico de la OMA [1]. . . . .	6
3.1. Características de las membranas sintetizadas en este trabajo. . . . .	23
4.1. Datos de liberación de ampicilina desde membranas de PLA obtenidos por F. Vera. . . . .	29
4.2. Datos de liberación de ampicilina desde membranas de PLA obtenidos en el presente trabajo. . . . .	30
4.3. Porcentaje de ampicilina liberado en la concentración máxima en el medio acuoso en relación a la masa total teórica en cada membrana. . . . .	39
A.1. Cantidad de ácido poli-láctico y ampicilina para sintetizar las membranas de distinto espesor y carga. . . . .	V
A.2. Cantidad de ácido poli-láctico y ampicilina para sintetizar las membranas de distinto espesor y carga. . . . .	VI
A.3. Tiempos de recolección de las muestras del día 1. . . . .	VIII
A.4. Tiempos de recolección de las muestras del día 2. . . . .	X
A.5. Tiempos de recolección de las muestras del día 3. . . . .	X
A.6. Tiempos de recolección de las muestras del día 4. . . . .	XI
C.1. Datos para la construcción de la curva de calibración área [mV-min] v/s concentración [mg/mL]. . . . .	XVII
C.2. Datos de la experiencia de liberación de ampicilina desde las membranas de PDL04 y 0,1 mm de espesor. Solución usada: buffer fosfato 0,01M a pH 7 y 37°C	CXVII
C.4. Datos de la experiencia de liberación de ampicilina desde las membranas de PDL04 y 0,33 mm de espesor. Solución usada: buffer fosfato 0,01M a pH 7 y 37°C . . . . .	XIX
C.6. Datos de la experiencia de liberación de ampicilina desde las membranas de PDL02 y 0,05 mm de espesor. Solución usada: buffer fosfato 0,01M a pH 7 y 37°C . . . . .	XX
C.8. Datos de la experiencia de liberación de ampicilina desde las membranas de PDL02 y 0,1 mm de espesor. Solución usada: buffer fosfato 0,01M a pH 7 y 37°C	CXXII
C.10. Datos de la experiencia de liberación de ampicilina desde las membranas de PDL02 y 0,33 mm de espesor. Solución usada: buffer fosfato 0,01M a pH 7 y 37°C . . . . .	XXIII

# Índice de ilustraciones

1.1.	Perfil de concentración de un sistema de liberación tradicional [2]. . . . .	1
1.2.	Perfil de concentración de un sistema de liberación controlada [2]. . . . .	2
2.1.	Diferencia entre un oído sano (arriba) y uno enfermo (abajo) [3]. . . . .	5
2.2.	Estructura molecular de la ampicilina (en rojo se engloba el anillo betalactámico). . . . .	7
2.3.	Productos de la degradación de ampicilina en soluciones ácidas o neutras [4]. . . . .	7
2.4.	Producto de la degradación de ampicilina en solución básica [4]. . . . .	8
2.5.	Hidrólisis de ampicilina a 35°C [5]. . . . .	8
2.6.	Método de síntesis de PLA (Adaptación [6–8]). . . . .	10
2.7.	Estados de la degradación de polímeros [9]. . . . .	11
2.8.	Microfotografías Electrónicas de Barrido de membranas de PLDLA dependientes del tiempo de degradación <i>in vitro</i> . Áreas (columna de la izquierda) y superficie (columna de la derecha) en el estado inicial (semana 0) y final del estudio (semana 20). Adaptación de [10]. . . . .	11
2.9.	Ilustración esquemática de los cambios en una matriz polimérica durante la erosión superficial (der.) y volumétrica (izq.) . . . . .	12
2.10.	Esquema que muestra el efecto de la liberación explosiva en un sistema de liberación de fármaco de orden cero [11]. . . . .	15
2.11.	Organización de varios modelos de liberación de fármaco de polímeros de volumen degradable [12]. . . . .	16
2.12.	Dos métodos de liberación de un fármaco desde un pellet considerados por T. Higuchi [13]. . . . .	17
2.13.	(A) Poro aislado dentro de la matriz y (B) su representación en el modelo de Lemaire et. al. [14]. . . . .	18
2.14.	Simulación de un modelo basado en Monte Carlo de la liberación de un fármaco desde un CRS de superficie erosionable [15]. . . . .	18
3.1.	Metodología para la etapa de modelamiento. . . . .	21
3.2.	Metodología para la parte experimental . . . . .	22
3.3.	Datos de liberación de ampicilina desde membranas de PLA obtenidos por F. Vera en su Memoria de Título [16]. . . . .	22
3.4.	Diagrama de toma de muestra para un punto x. . . . .	26
4.1.	A la derecha, resultado de despegar la membrana desde la placa Petri con base de teflón. A la izquierda, membrana de 1cm x 1cm en su tubo Falcon. . . . .	31
4.2.	Curva de calibración de concentración de ampicilina en <i>buffer</i> fosfato. . . . .	31



4.3. Comparación de los <i>peaks</i> obtenidos para una muestra del cultivo con <i>E. coli</i> y <i>buffer</i> fosfato con ampicilina. . . . .	33
4.4. Resultados de la experiencia de liberación para PDL04-01. . . . .	34
4.5. Resultados de la experiencia de liberación para PDL04-033. . . . .	34
4.6. Resultados de la experiencia de liberación para PDL02-005. . . . .	35
4.7. Resultados de la experiencia de liberación para PDL02-01. . . . .	35
4.8. Resultados de la experiencia de liberación para PDL02-033. . . . .	36
4.9. Comparación de los perfiles de liberación de membranas PDL04. . . . .	37
4.10. Comparación de los perfiles de liberación de membranas PDL02. . . . .	38
4.11. Fenómenos seleccionados para el modelamiento del sistema PLA-ampicilina. . . . .	41
4.12. Simulaciones para la liberación de ampicilina en el medio acuoso para los tres espesores de membranas de PDL04 estudiados en este trabajo, para distintos valores de $D_p$ . . . . .	43
4.13. Simulaciones para la liberación de ampicilina en el medio acuoso para los tres espesores de membranas de PDL04 estudiados en este trabajo, para distintos valores de $D_p$ y $k_{amp}$ . . . . .	45
4.14. Simulaciones para la liberación de ampicilina en el medio acuoso para los tres espesores de membranas de PDL04 estudiados en este trabajo, para distintas condiciones iniciales. . . . .	46
4.15. Simulaciones para la liberación de ampicilina en el medio acuoso para los tres espesores de membranas de PDL04 estudiados en este trabajo, para distintas funciones del coeficiente de difusión de ampicilina en el polímero. . . . .	47
4.16. Simulaciones para la liberación de ampicilina en el medio acuoso para los tres espesores de membranas de PDL02 estudiados en este trabajo, para distintas funciones del coeficiente de difusión de ampicilina en el polímero. . . . .	48
4.17. Simulaciones para la liberación de ampicilina en el medio acuoso desde membranas de PDL04. . . . .	50
4.18. Simulación del diseño resultante del dispositivo. . . . .	51
B.1. Reporte de medición entregado por el equipo de RT-HPLC para la muestra m3.3b para el experimento de liberación de la membrana PDL02-005. . . . .	XVI

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Antecedentes Generales

Junto con el crecimiento de la industria farmacéutica se ha ido desarrollando el área encargada de la elaboración de sistemas de administración de fármacos, también conocidos como *Drug Delivery System* (DDS). Esto debido a que cada vez se ha hecho más relevante elaborar sistemas que permitan una administración adecuada del principio activo, además de cumplir con las necesidades que puedan presentar los clientes y pacientes.

Dentro de los DDS clásicos se encuentran, por ejemplo, las píldoras, inyecciones, jarabes, ungüentos e inhaladores. Estos sistemas suelen presentar un perfil de concentración en el cuerpo como el que se muestra en la Figura 1.1, en donde es necesario realizar dosis reiteradas del fármaco para que éste se encuentre en un rango en que su principio activo sea efectivo. Sin embargo, y como se puede observar en esta figura, en ocasiones las concentraciones del principio activo pueden caer a niveles en que no es efectivo contra la enfermedad por la que fue administrado, o puede llegar a sobrepasar el umbral deseado y alcanzar concentraciones tóxicas [17].

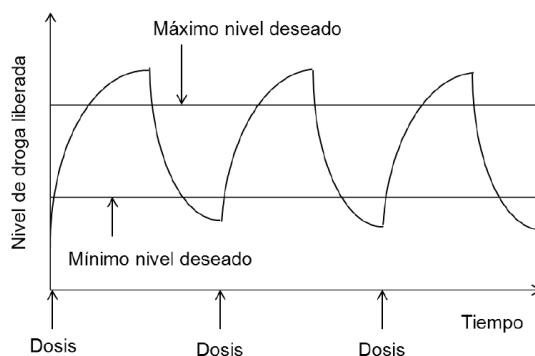


Figura 1.1: Perfil de concentración de un sistema de liberación tradicional [2].

Es debido a esto que desde hace más de 100 años tales dispositivos han comenzado a ser

desplazados por un nuevo tipo de sistemas llamados de liberación controlada o *Controlled Release Systems* (CRS) [18], los cuales pueden generar dos tipos de control de la liberación del fármaco: temporal y espacial.

El control temporal consiste en mantener la concentración del principio activo constante y dentro de los rangos deseados de efectividad y no toxicidad, como se puede ver en la Figura 1.2. Esto se logra protegiendo a la molécula del medio acuoso, inhibiendo la difusión fuera del dispositivo o controlando el flujo del fármaco en solución, evitando de esta forma que el fármaco difunda libremente en el medio acuoso que lo disuelve como es el caso de los sistemas tradicionales [19].

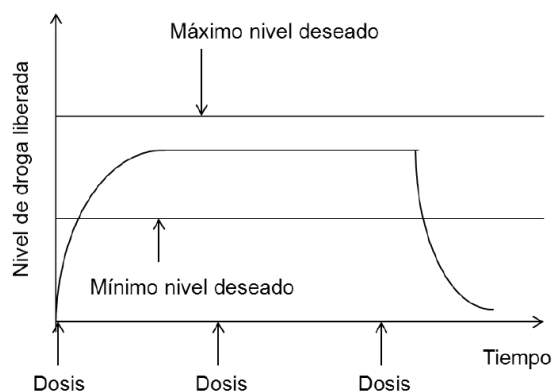


Figura 1.2: Perfil de concentración de un sistema de liberación controlada [2].

El otro tipo de control que pueden realizar los CRS es el control espacial, el cual consiste en que el fármaco sólo actúa en la zona donde se quiere que ejerza su efecto, siendo el método más simple de lograr este efecto, la implantación del dispositivo directamente en ese sitio [17, 19]. Cabe destacar que algunos de estos dispositivos de liberación controlada pueden incluso albergar ambos tipos de control.

De esta forma, los CRS poseen numerosas ventajas comparados con los sistemas tradicionales, tanto para la industria como a los pacientes, debido a que son capaces de mejorar la eficiencia del tratamiento, para reducir toxicidad, y mejorar el cumplimiento y conveniencia de los pacientes, lo cual conlleva a reducir la cantidad del fármaco administrado y ser útiles para tratamientos prolongados, eliminando la necesidad de administración especializada del fármaco, como son las inyecciones repetitivas [19].

Este tipo de sistemas puede ser especialmente beneficioso para distintas clases de fármacos, como los utilizados para tratamiento de quimioterapia [20, 21], inmunosupresores [22], antiinflamatorios [23–25], vacunas [26], esteroides [27], hormonas [28], anestésicos [29] y antibióticos [30].

## 1.2. Antecedentes del Proyecto

Bajo el contexto anterior es que se desarrolla la idea propuesta por el Dr. Goycoolea, quien plantea en su trabajo el uso de un dispositivo de liberación controlada que permita la liberación prolongada de un antibiótico, con el fin de tratar la Otitis Media Aguda (OMA) [31,32].

La OMA consiste en la inflamación e infección del oído medio debido al bloqueo de la Trompa de Eustaquio, el que genera la acumulación de líquido en la zona posterior del tímpano, haciéndola propensa a una infección. De este modo, esta enfermedad resulta ser más frecuente en bebés y niños ya que en ellos la Trompa de Eustaquio se obstruye con mayor facilidad [3].

El tratamiento de esta enfermedad consiste en la administración sistemática de antibióticos (como ampicilina, amoxicilina y gentamicina) junto con agentes antiinflamatorios y analgésicos. Sin embargo, estos DDS utilizados en la actualidad presentan los mismos problemas expuestos anteriormente, por lo que se sugirió el desarrollo de un CRS correspondiente a una membrana de Ácido Poliláctico (o *Polylactid Acid*, PLA) cargada homogéneamente con ampicilina.

La idea de este dispositivo es que sea capaz de administrar el antibiótico de forma prolongada y localizada, para lo cual la membrana debe tener un tamaño que permita su inserción en el oído medio mediante una cirugía y, debido a que el PLA es biodegradable, no requeriría de una segunda cirugía para su extracción.

Por otro lado, desde la publicación de Higuchi en 1961 [33] ha habido un incremento en el desarrollo de modelos capaces de describir los perfiles de concentraciones liberados por CRS's, los cuales han ido considerando variados enfoques y diversas técnicas de modelamiento. Esto debido a que las simulaciones *in silico* poseen grandes ventajas, tales como: un mejor estudio de los fenómenos involucrados, la optimización de los parámetros de diseño de estos sistemas, la disminución en costos de diseño, debido a la posibilidad de realizar una gran cantidad de simulaciones y expansión del modelo a sistemas similares, en el caso de que el modelo resulte describir adecuadamente la fenomenología del sistema.

Dentro de este contexto, es que anteriormente se ha trabajado en el desarrollo de un modelo que permita describir el sistema propuesto por el Dr. Goycoolea et al., en los cuales se han obtenido datos experimentales *in vitro* para la liberación de ampicilina de membranas de PLA con dimensiones de 1 cm x 1 cm y distintos espesores de membrana y cargas iniciales del antibiótico. Además, el modelo desarrollado corresponde a un modelo global de transferencia de masa que incorpora los fenómenos de difusión desde la matriz polimérica al medio acuoso que lo rodea, la degradación de la ampicilina por reacción ácido-base y la variación del área de transferencia efectiva por la degradación del PLA [16,34].

### 1.3. Descripción del proyecto y justificación

Debido a la falta de una etapa de diseño para la síntesis de membranas biodegradables cargadas con antibiótico, y a la gran importancia que ha adquirido dicha etapa para el desarrollo de este tipo de sistemas, con el fin de generar dispositivos óptimos en su funcionalidad y que sean capaces de satisfacer las necesidades de los pacientes que lo utilicen, es que surge el interés de desarrollar un proyecto que incluya este paso.

El desarrollo de este proyecto consistió principalmente en 2 etapas: en una primera etapa se continuó el modelamiento matemático realizado por Fernando Vera [16] y Diego Diaz [34], el cual fue desarrollado inicialmente en Matlab®, y posteriormente implementado en COMSOL Multiphysics®, y una segunda fase experimental en la cual se sintetizaron membranas similares a las elaboradas por el equipo del Dr. Goycoolea [31] con el fin de obtener nuevos datos de liberación de ampicilina *in vitro* que permitan ampliar el rango de los parámetros de diseño a estudiar.

La etapa experimental se llevará a cabo en el Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBIB) a cargo de la Dr. Ziomara Gerdtzen H. Y la etapa de modelamiento se realizará bajo la supervisión del Dr. J. Cristian Salgado H. y la Dr. Ziomara Gerdtzen H. El desarrollo de un modelo matemático con base en la fenomenología del sistema tiene como objetivo ser una herramienta para la etapa de diseño del sistema estudiado, que permita evaluar y determinar parámetros de diseño óptimos, tales como: tamaño, geometría, concentración inicial del antibiótico en su interior o peso molecular del polímero a utilizar. Por otro lado, debido a la naturaleza del modelo desarrollado, se espera que éste pueda ser utilizado para el diseño y optimización de sistemas similares.

# Capítulo 2

## Marco Teórico

### 2.1. Otitis Media Aguda

La otitis media corresponde a la inflamación y/o infección del oído medio que causa la producción de un fluido o pus que queda atrapado por el cierre de la Trompa de Eustaquio. Usualmente, esta condición genera una multiplicación de los gérmenes en el oído medio, lo cual pasa a llamarse Otitis Media Aguda (OMA). Una comparación entre un oído sano y uno con OMA se puede ver en la Figura 2.1.

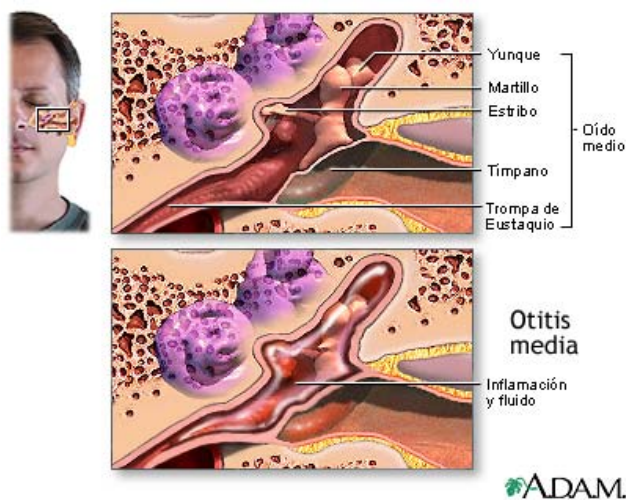


Figura 2.1: Diferencia entre un oído sano (arriba) y uno enfermo (abajo) [3].

Los microorganismos más comunes causantes de la OMA en Santiago de Chile, de acuerdo a estudios locales, son *Streptococcus pneumoniae* (40%), *Haemophilus influenzae* (29%), *Streptococcus pyogenes* (7%) y *Moraxella catarrhalis* (4%) [35].

La OMA afecta principalmente a bebés y niños, en parte porque sus trompas de Eustaquio se obstruyen fácilmente. Sin embargo, estas infecciones del oído también pueden ocurrir en

adultos, aunque son menos comunes que en los niños [3].

El tratamiento de esta enfermedad consiste principalmente en el uso de antimicrobianos para eliminar la presencia de los microorganismos, para lo cual se requiere que esté en concentraciones en las que inhiba el crecimiento bacteriano, como se muestra en la Tabla 2.1. Además, se utiliza en conjunto antiinflamatorio y analgésicos que ayudan a reducir el dolor y el malestar en los pacientes.

Tabla 2.1: Tratamiento a base de antibiótico de la OMA [1].

Antibiótico	Dosis estándar [mg/kg/día]	Dosis altas [mg/kg/día]	Frecuencia	Duración [días]
Amoxicilina	40 - 50	80 - 90	TID	5 - 10
Amoxicilina + clavulánico	40 + 10	80 - 90 + 10	TID	5 - 10
Cefuroxima-axetilo	30	-	BID	5 - 10
Ceftriaxona	50	-	QD	1 - 3
Azitromicina	10	-	QD	5
Claritromicina	15	-	BID	5 - 10

A pesar de que la amoxicilina es la primera opción para el tratamiento de la OMA, como se observa en la tabla anterior, la ampicilina fue el antibiótico más utilizado hasta los años 90's debido a su fácil administración oral, baja toxicidad y amplio espectro antimicrobiano.

### 2.1.1. Ampicilina

Como se expuso anteriormente, a pesar de que la amoxicilina es el principal antibiótico contra la OMA, la ampicilina era el antibiótico estándar cuando se ideó el sistema de membranas biodegradables como tratamiento alternativo a la otitis [31]. Debido a esto es que en el presente proyecto se utilizó ampicilina con el objetivo de sintetizar y diseñar sistemas similares a los propuestos originalmente.

La ampicilina es un antibiótico derivado de la penicilina que se dice betalactámico, debido a que posee un anillo betalactámico en su estructura molecular (Figura 2.2). Este anillo le confiere su mecanismo de acción mediante la unión a proteínas bacterianas intracelulares, denominadas proteínas de fijación de penicilinas (PFP), lo que desencadena la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, y que provoca, en ocasiones la lisis de la pared celular [36].

### Degradación de ampicilina

La principal causa de la degradación de la ampicilina, y por lo tanto la pérdida de su función bactericida, es la hidrólisis del anillo betalactámico. Además, al ser una molécula anfotérica la ampicilina es capaz de sufrir catálisis ácido-base específica, es decir, la velocidad de degradación se ve aumentada con la presencia de ión hidrógeno ( $H^+$ ) o ion hidróxido

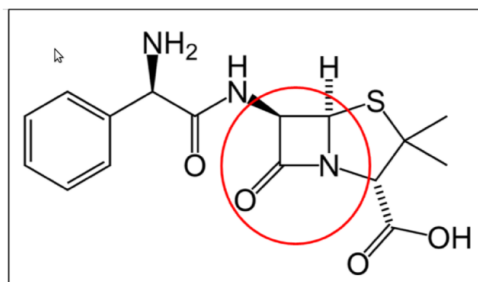


Figura 2.2: Estructura molecular de la ampicilina (en rojo se engloba el anillo betalactámico).

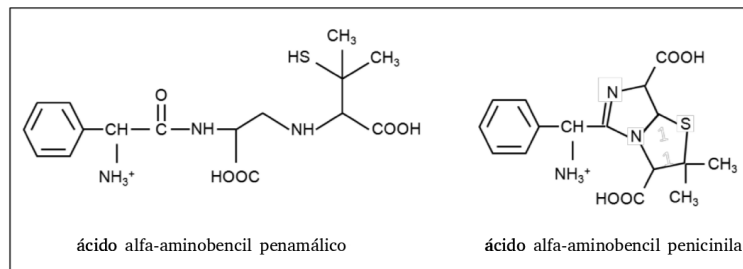
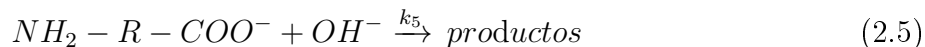
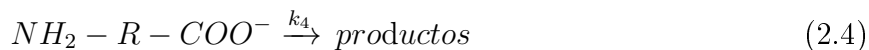
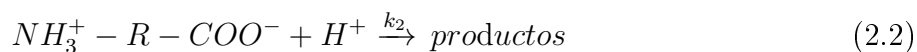
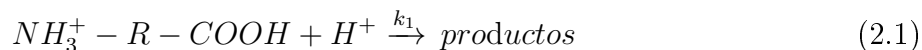


Figura 2.3: Productos de la degradación de ampicilina en soluciones ácidas o neutras [4].

(OH<sup>-</sup>), respectivamente. Debido a esto es que la degradación de esta molécula es además dependiente del pH [5].

Los valores de pKa del grupo carboxilo y amino son 2,65 y 7,24 respectivamente [37] y las reacciones que pueden sufrir los tres estados iónicos de la ampicilina son:



Las constantes  $k_1$  y  $k_2$  pertenecen a reacciones catalíticas ácido específica de segundo orden,  $k_3$  y  $k_4$  son constantes de hidrólisis de primer orden de la ampicilina zwitteriónica y aniónica, respectivamente, y  $k_5$  es la constante de la reacción catalítica base específica de segundo orden. Por otro lado, los productos resultantes de la degradación de ampicilina en medios ácidos o neutros se muestran en la Figura 2.3, mientras que en solución básica el producto resultante es el que se ve en la Figura 2.4.



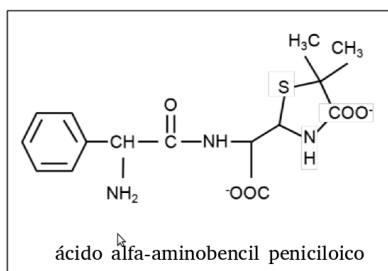


Figura 2.4: Producto de la degradación de ampicilina en solución básica [4].

A pesar de las cinéticas de degradación descritas anteriormente, para un pH constante es posible representar la degradación de ampicilina con una cinética de primer orden [5,38]:

$$\frac{dP}{dt} = k_{obs}[S] \quad (2.6)$$

Donde  $k_{obs}$  es una constante de reacción aparente,  $P$  son los productos de degradación y  $S$  representa la ampicilina. En la Figura 2.5 se muestra la relación entre el logaritmo de  $k_{obs}$  y el pH en una solución acuosa a 35°C [5].

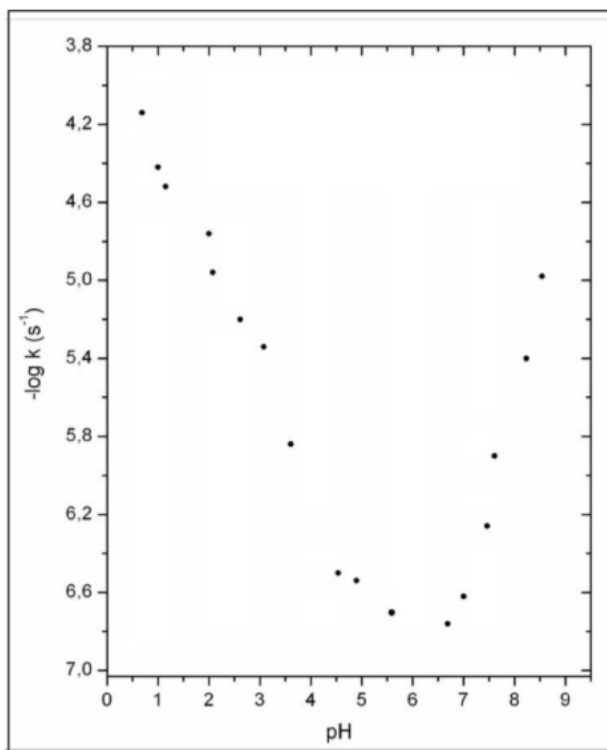


Figura 2.5: Hidrólisis de ampicilina a 35°C [5].

Además de las reacciones anteriores, se ha demostrado que en soluciones de *buffer* fosfato y *buffer* citrato, la ampicilina sufre degradación por catálisis ácido y base general. La cinética de esta hidrólisis también se ha observado que es de primer orden y puede ser representada perfectamente por la ecuación 2.6 ([5]).

En un trabajo anterior [16], se determinó que la constante cinética de degradación de ampicilina descrita por la Ecuación 2.6 es igual a  $4,4 \times 10^3 [h^{-1}]$  para una temperatura de  $37^\circ C$  y en una solución de *buffer* fosfato, que son las que se utilizan en este trabajo.

## 2.2. Ácido Poli-Láctico y su aplicación como DDS

El ácido poliláctico, o PLA por sus siglas en inglés, pertenece a la familia de los poliéster alifáticos, los cuales son considerados biodegradables y compostables. Es uno de los pocos polímeros en los que se puede modificar fácilmente su estructura estereoquímica controlando la cantidad de los isómeros ópticos L- o D-, además de ser degradado por simple hidrólisis sin la necesidad de la presencia de enzimas, siendo la velocidad de degradación dependiente del tamaño y forma del dispositivo, de la razón de los isómeros que lo conforman y de la temperatura de hidrólisis [39].

Cabe destacar que PLA puede ser fabricado a partir de fuentes renovables anualmente para producir artículos para el uso en el área de empaque industrial o en el mercado de dispositivos médicos biocompatibles/bioabsorbibles [6]. En el trabajo de Kulkarni et. al. en 1996 [40] se concluye que el PLA es no tóxico y no reacciona con los tejidos del cuerpo, por lo que hace posible su uso en dispositivos médicos, y posteriormente en 1973, es propuesto como matriz degradable para la administración de sustancias bioactivas [41].

En la actualidad, su uso se extiende a otros dispositivos como implantes, DDS y andamiaje (*scaffold*) para el crecimiento de tejidos [7,42,43], debido a que es un material biodegradable que no hace necesaria una segunda cirugía para su remoción, lo que reduce los costos médicos.

### 2.2.1. Síntesis de ácido poliláctico

PLA corresponde a un polímero que, como indica su nombre, está formado por monómeros de ácido láctico, los cuales se pueden encontrar en una o ambas formas de sus isómeros ópticos. Esto permite que existan 3 tipos de PLA: PLLA (*Poly L-lactide acid*), PDLA (*Poly D-lactide acid*) y PDLLA (*Poly D,L-lactide acid*) [7,44].

El ácido láctico puede ser producido por la fermentación de azúcares obtenidos de fuentes renovables como la caña de azúcar. Y debido a que la degradación de este polímero se realiza por simple hidrólisis, éste puede ser producido y usado en un amigable ciclo medioambiental [7]. Por su parte, existen variadas formas de producir PLA, y nunca resulta ser simple o fácil de ejecutar debido a que requiere rigurosas condiciones de control (temperatura, presión y pH), el uso de catalizadores y largos tiempos de polimerización, que implican grandes consumos de energía [7].

PLA puede ser producido por diversos procesos de polimerización a partir de ácido láctico. incluyendo: métodos directos como deshidratación azeotrópica y polimerización enzimática

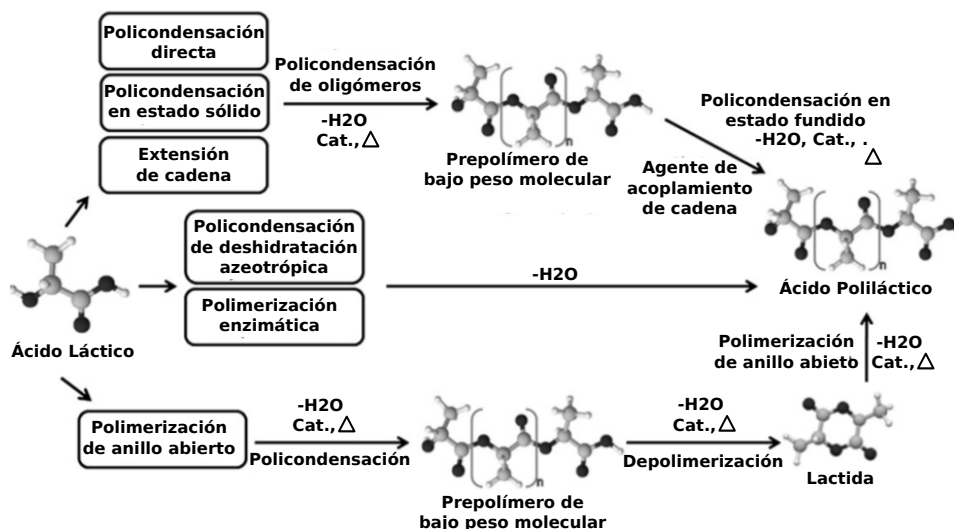


Figura 2.6: Método de síntesis de PLA (Adaptación [6–8]).

y policondensación, polimerización del anillo abierto (Figura 2.6). Este último es el más usado y corresponde a un proceso multietapas que incluye el aislamiento de una lactida intermediaria (dímero cíclico del ácido láctico), seguido por una polimerización del anillo abierto. Usualmente, la polimerización mediante lactida es muy lenta, por lo que se suele utilizar catalizadores con Zn o Sn que activan el éster carboxílico. Ejemplos de catalizadores utilizados y que no causan efectos citotóxicos son  $Sn^{II}(CO_2CH(^nBu)(Et))_2$ , el cual fue aprobado por la FDA<sup>1</sup> [45].

En el caso de la degradación de polímeros, y en particular para PLA, existe una clasificación en dos niveles distintos de este fenómeno: degradación y erosión.

### 2.2.2. Biodegradación de ácido poliláctico

La biodegradación se refiere a la ruptura de los enlaces del polímero, siendo por lo tanto un proceso químico, y es una característica deseable en los CRS debido a que el metabolismo y la excreción del organismo son capaces de removerlo completamente [19].

Como se dijo anteriormente, la degradación de PLA ocurre por la simple hidrólisis de sus enlaces éster, sin la necesidad de reacciones enzimáticas, siendo los subproductos de esta reacción posibles de eliminar a través de la actividad celular o la orina [7].

A partir de estudios *in vitro* se observa que cuando el polímero es inmerso en agua, esta ingresa al interior del dispositivo y comienza la ruptura de los enlaces éster. En estados iniciales, la degradación ocurre con mayor velocidad en la superficie del polímero que en su interior, debido al gradiente de absorción de agua. Sin embargo, a medida que ocurre la

<sup>1</sup>Food and Drug Administration

degradación se van formando ácidos carboxílicos como productos de degradación en ambas zonas del polímero, que se acumulan con mayor facilidad en el centro debido a que se disuelven más rápidamente en el medio. La presencia de estos ácidos carboxílicos catalizan la reacción de degradación, lo que produce que la erosión volumétrica sea finalmente más rápida que la superficial. Las distintas etapas del proceso de degradación de un polímero se pueden observar en la Figura 2.7

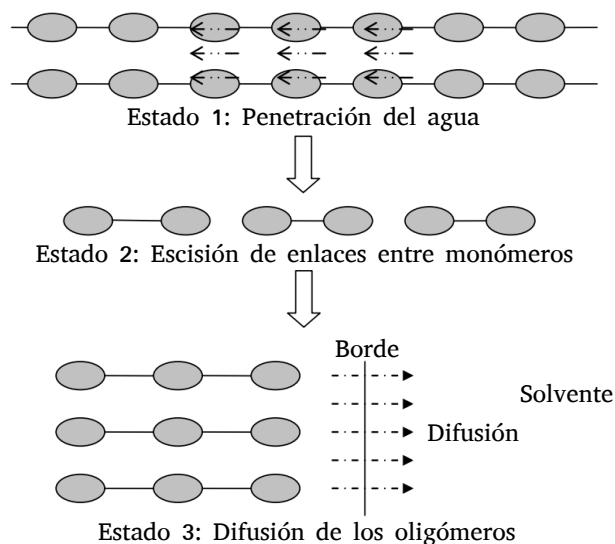


Figura 2.7: Estados de la degradación de polímeros [9].

Como consecuencia de esta degradación se ha observado la formación de poros los cuales están directamente relacionados con el tiempo de degradación, los cuales se comienzan a formar tras la octava semana y son macroscópicamente visibles a las 16 semanas después [10] como se observa en las Figura 2.8.

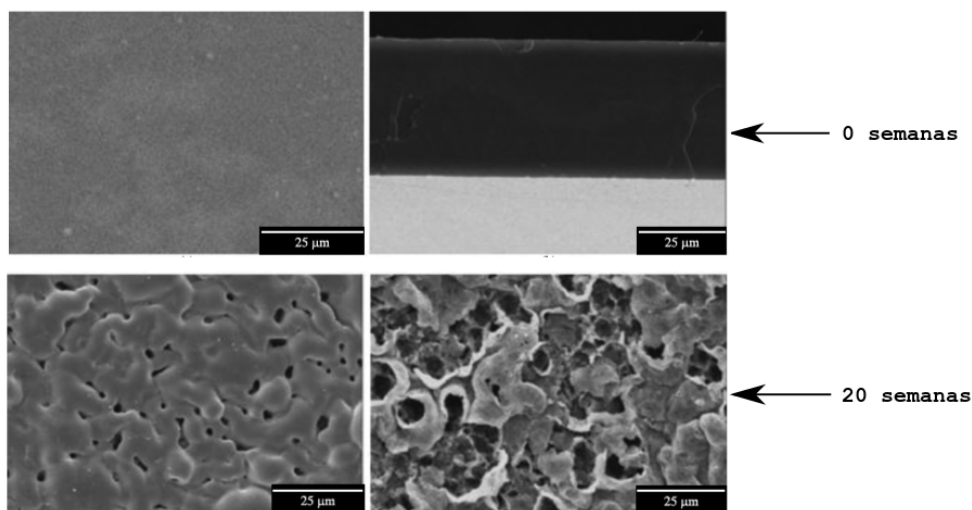


Figura 2.8: Microfotografías Electrónicas de Barrido de membranas de PLDLA dependientes del tiempo de degradación *in vitro*. Áreas (columna de la izquierda) y superficie (columna de la derecha) en el estado inicial (semana 0) y final del estudio (semana 20). Adaptación de [10].

### 2.2.3. Erosión de un sistema de ácido poliláctico

Por otro lado, el término erosión hace referencia al fenómeno físico del agotamiento del material. En este sentido, pueden ser identificados dos mecanismos de erosión de un polímero, superficial (*surface erosion*) y volumétrica (*bulk erosion*), los que se pueden observar en la Figura 2.9. Éstas representan extremos de la forma en la que se puede degradar un polímero, pero que ocurren simultáneamente en proporciones dependientes de las características del polímero [19].

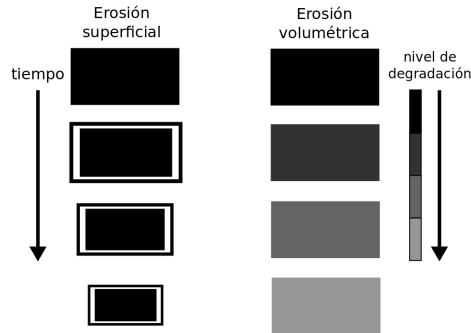


Figura 2.9: Ilustración esquemática de los cambios en una matriz polimérica durante la erosión superficial (der.) y volumétrica (izq.)

La erosión superficial ocurre cuando la cinética de degradación es mayor a la velocidad de penetración de agua en el volumen, la cual suele ser una característica deseable en los polímeros debido a su alta reproducibilidad y a que la velocidad de erosión resulta ser directamente proporcional al área de la superficie externa.

Por el contrario, la erosión volumétrica sucede cuando la velocidad de ingreso del agua al polímero es más rápida que la degradación de éste, lo que trae como consecuencia que la cinética de degradación resulte más compleja. A pesar de lo anterior, polímeros con tales propiedades han sido utilizados exitosamente como DDS, incluyendo a los poli(éster) entre los que se encuentra el PLA [19].

Por otro lado, se ha estudiado la pérdida del peso molecular promedio de PLA producto de la degradación, en donde se ha visto una relación lineal entre este parámetro y el tiempo de degradación para un polímero con peso molecular mayor a  $15.000 \text{ gr/mol}$ , la cual puede ser descrita por la Ecuación 2.7 de primer orden [46]:

$$M_w = M_w^0 \exp(-kt) \quad (2.7)$$

donde  $M_w$  corresponde al peso molecular promedio en función del tiempo,  $M_w^0$  es el peso molecular promedio en el tiempo cero y  $k$  es la constante de velocidad promedio de escisión de la cadena la cual fue determinada como  $0,104 \text{ [d}^{-1}\text{]}$  [46, 47].

## 2.3. Mecanismos de liberación de fármacos

Dependiendo de la composición del dispositivo degradable (tipo de polímero, carga de fármaco, aditivos) y la geometría (tamaño y forma), numerosos fenómenos de transporte de masa y reacciones químicas afectan la cinética resultante de la liberación del fármaco [48]:

- Ingreso de agua al dispositivo
- Disolución del fármaco
- Degradación del polímero
- Creación de poros acuosos
- Difusión del fármaco
- Acumulación de productos de degradación dentro de la matriz
- Cristalización de los productos de la degradación del polímero y/o del fármaco dentro del sistema
- Cambios en los microambientes de pH dentro de la matriz polimérica debido a productos de degradación
- Difusión de la droga y/o productos de degradación del polímero dentro de los poros
- Difusión de hidrógenos y/o hidroxilos desde el medio hacia el interior del dispositivo
- Efecto autocatalítico durante la degradación del polímero
- Efecto osmótico
- Hinchamiento del polímero
- Procesos de convección
- Procesos de absorción/desorción

Sin embargo, no es razonable considerar todos estos fenómenos, debido a que el estudio del fenómeno de liberación se tornaría muy complejo, por lo cual sólo se consideran los procesos físicos y químicos que resultan ser dominantes, siendo los más importantes en la liberación del fármaco en sistemas poliméricos la difusión del fármaco en el polímero y la solubilización del polímero [49].

En sistemas similares al PLA con ampicilina [50] y en etapas anteriores de este proyecto [16, 34] se ha estudiado la difusión de la ampicilina a través de la matriz polimérica como mecanismo de liberación del fármaco. Sin embargo, la difusión por sí misma no ha sido capaz de predecir correctamente los perfiles de liberación del antibiótico, especialmente en fases tardías del proceso de liberación. Debido a lo anterior es que se propone incorporar al estudio los fenómenos de degradación del soporte polimérico y la liberación explosiva.

### 2.3.1. Difusión

La transferencia de masa corresponde al movimiento de la materia de un lugar a otro, siendo la difusión uno de los mecanismo por el cual esto ocurre es la difusión. Ésta es

ocasionada por el movimiento aleatorio de las partículas que se traduce en un desplazamiento de éstas desde una región de mayor concentración a uno de menor concentración, lo que lleva a una mezcla completa de los compuestos. Su importancia radica en que usualmente es un proceso lento, que puede llegar a ser la etapa limitante dentro de una serie de procesos secuenciales.

Este mecanismo puede ser descrito matemáticamente mediante dos tipos de leyes. La primera, correspondiente a la Ecuación 2.8, no tiene un nombre formal, y utiliza el coeficiente de transferencia de masa  $k$  y la diferencia de concentración. Es una descripción de carácter empírico y simple del proceso de difusión, y sólo da cuenta del flujo de masa que pasa a través de un área determinada.

$$J = -k\Delta c \quad (2.8)$$

Por otro lado, la ecuación fundamental de estas representaciones es la Primera Ley de Fick (Ecuación 2.9), la cual involucra el coeficiente de difusión  $D$ . Ésta corresponde a una descripción más general y fundamental de la transferencia de masa y sólo es válida para medios isotrópicos.

$$J = -D \frac{\delta C}{\delta x} \quad (2.9)$$

En esta ecuación,  $J$  es el flujo de materia por unidad de área de transferencia,  $C$  la concentración de la sustancia que difunde y  $x$  es la dirección espacial normal a la sección.

Si el coeficiente de difusión se considera constante, la velocidad de transferencia de masa que pasa a través de una unidad de área se puede expresar mediante la que se conoce como la Segunda Ley de Fick:

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D \frac{\delta^2 C}{\delta x^2} \quad (2.10)$$

La difusión en sólidos toman lugar por mecanismos que dependen de la difusión de la molécula; la naturaleza estructural del sólido; si es poroso o no poroso; cristalino o amorfo; y el tipo de material sólido (metal, cerámica, polímero, biológico o celular). En medios porosos, una combinación de los siguientes cuatro mecanismos se pueden llevar a cabo [51]:

- Difusión molecular a través de los poros, los cuales presentan tortuosidad y dificultad al movimiento de las moléculas.
- Difusión de Knudsen, la cual incluye la colisión de los gases que difunden con las paredes del poro.
- Difusión superficial por las paredes de los poros.
- Flujo a través del sólido o de los poros.

Una forma de poder describir la difusividad de una molécula en un sólido poroso es mediante el modelo del símil homogéneo que se muestra en la Ecuación 2.11. Este modelo describe una Difusividad efectiva ( $D_{eff}$ ) de la molécula dependiente de una Difusividad equivalente promedio ( $D_m$ ). Este valor a su vez es ponderado por el volumen disponible para la difusión (porosidad del sólido  $e$ ) y el factor de tortuosidad ( $\tau$ ), el cual mide el aumento del camino a recorrer por la molécula en los poros debido a los obstáculos presentados por el sólido [51].

$$D_{eff} = D_m \times \frac{e}{\tau} \quad (2.11)$$

### 2.3.2. Liberación Explosiva

En muchos sistemas, una gran cantidad de fármaco es liberado al instante que éste entra en contacto con el medio, alcanzando posteriormente un perfil de concentración estable. Este fenómeno es conocido como Liberación Explosiva (o *Burst release*, en inglés) y el esquema de su efecto en los perfiles de liberación se ilustra en la Figura 2.10. Aquí se observa que al inicio de la liberación, el perfil de concentración del *burst release* posee una pendiente mayor que un perfil de orden cero, lo cual produce que alcance una concentración estable antes que otro sistemas.

Debido a que ocurre en un corto período de tiempo, la liberación explosiva no ha sido investigada en la mayoría de los resultados publicados, y ha sido ignorada en muchos de los modelos matemáticos [11].

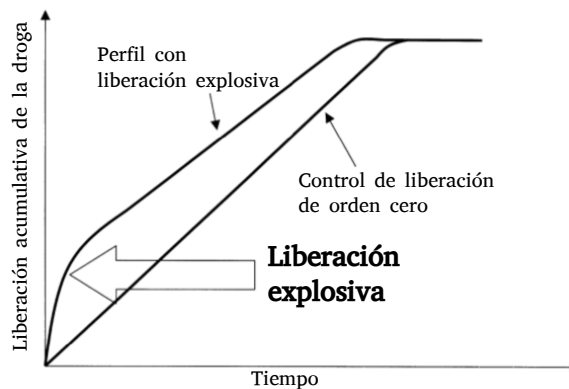


Figura 2.10: Esquema que muestra el efecto de la liberación explosiva en un sistema de liberación de fármaco de orden cero [11].

En matrices monolíticas, la causa de este fenómeno se puede atribuir a las condiciones de síntesis y fabricación de los dispositivos, heterogeneidad de la matriz y propiedades del fármaco [11].

Debido a que este efecto fue observado en los resultados experimentales de liberación de ampicilina desde membranas de PLA [16] es que se considera relevante su inclusión en el



presente estudio.

## 2.4. Modelamiento matemático de CRS

Debido a la variedad y complejidad de los mecanismos involucrados en la liberación de fármacos, y en especial desde polímeros biodegradables, es que se torna difícil la optimización en el diseño de estos sistemas. Es por esto que se han desarrollado ecuaciones matemáticas y se ha aplicado métodos computacionales con tal de lograr este propósito.

De acuerdo a los fenómenos considerados y la metodología utilizada, los modelos desarrollados para volúmenes degradables se pueden clasificar en dos grandes tipos: matemáticos y basados en Monte-Carlo (o estocásticos), como se muestra en la Figura 2.11.

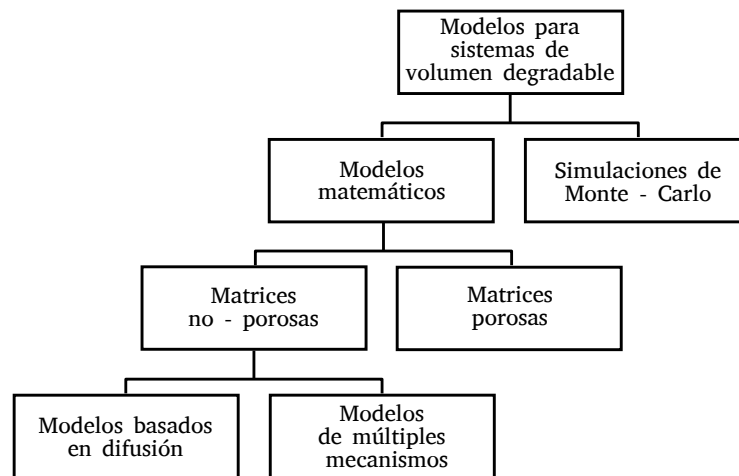


Figura 2.11: Organización de varios modelos de liberación de fármaco de polímeros de volumen degradable [12].

El primer modelo en este campo de los CRS corresponde a un modelo matemático basado en la difusión y fue desarrollado en 1961 por T. Higuchi [33]. Describe el perfil de liberación de un fármaco que se encuentra en suspensión en un ungüento, asumiendo que, como existe difusión en pseudo estado estacionario, se puede aplicar la Primera Ley de Fick (Ecuación 2.9). En su trabajo, Higuchi desarrolla ecuaciones para sistemas en donde el fármaco difunde a través de una matriz homogénea y para la difusión del soluto a través de una matriz porosa, como se muestra en la Figura 2.12. También considera dos geometrías, liberación unidireccional desde una superficie plana y la liberación tridimensional desde un pellet esférico.

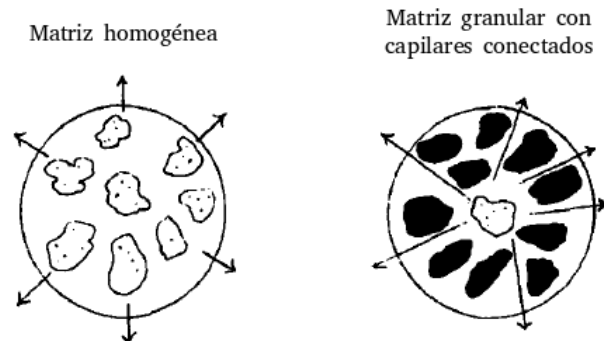


Figura 2.12: Dos métodos de liberación de un fármaco desde un pellet considerados por T. Higuchi [13].

Otros modelos desarrollados a partir del modelo de Higuchi han incorporado nuevos fenómenos, como la degradación de la matriz. Entre estos trabajos destacan el trabajo de Charlier et al. (2000) el cual postula que el coeficiente de difusión del soluto en el polímero ( $D_t$ ) depende de la velocidad de degradación del polímero según las constantes cinéticas que se presentaron en la Ecuación 2.7, como se indica en la Ecuación 2.12.

$$D_p1(t) = D_0 \exp(kt) \quad (2.12)$$

También cabe mencionar el modelo desarrollado por Koizumi y Panonsik (1995), en donde el coeficiente difusivo se expresa según la Ecuación 2.13, donde  $c$  es una constante y  $M_w(t)$  se puede describir según la Ecuación 2.7.

$$D_p2(t) = D_0 + c/M_w(t) \quad (2.13)$$

A pesar de la gran importancia que han alcanzado estos modelos debido a que resultan sencillos en su formulación, el hecho de estar sujetos al supuesto de estado pseudo-estacionario produce que se esté despreciando parte de la dinámica del problema. En estos casos, debido a que lo que se estudia es el fenómeno de difusión al interior del dispositivo, se supone que la concentración del soluto en el medio externo es constante, impidiendo que se pueda realizar un mayor estudio de la dinámica del fenómeno en este dominio.

Por su lado, modelos considerados de múltiple mecanismos incorporan además del mecanismo de difusión y degradación del fármaco, otros fenómenos más complejos como el ingreso de agua, el efecto de los productos de la degradación de la matriz, liberación explosiva del fármaco, entre otros [12].

Los modelos desarrollados para matrices porosas pueden considerar una combinación de la teoría del transporte de masa difusional y la percolación, o también representar el fenómeno de degradación mediante la partición de la matriz entre múltiples e idénticos elementos idealizados como cilindros, que simulan ser los poros [12]. Tal es el caso del trabajo

desarrollado por Lemaire et. al [14], mostrándose en la Figura 2.13 los poros como subunidades de la estructura y su idealización para el modelamiento en su trabajo.

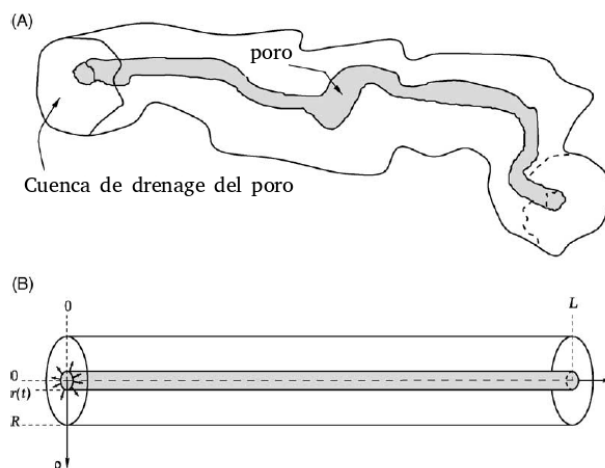


Figura 2.13: (A) Poro aislado dentro de la matriz y (B) su representación en el modelo de Lemaire et. al. [14].

Finalmente, los modelos basados en Monte-Carlo asumen que la degradación es una condición necesaria para la erosión, la cual sólo ocurre cuando el polímero está en contacto con el agua. De esta forma, sólo una sección del polímero que está en contacto con el medio tendrá una probabilidad de desaparecer, permitiendo que el agua ingrese a la matriz y tenga contacto con otras secciones del polímero [12]. En estos casos se obtienen simulaciones como las que se muestra en la Figura 2.14, y algunos de los trabajos realizados en con este tipo de enfoque fueron desarrollados por Zygourakis [15], Gdpferich y Langer [52], Siepmann y Gdpferich [48].

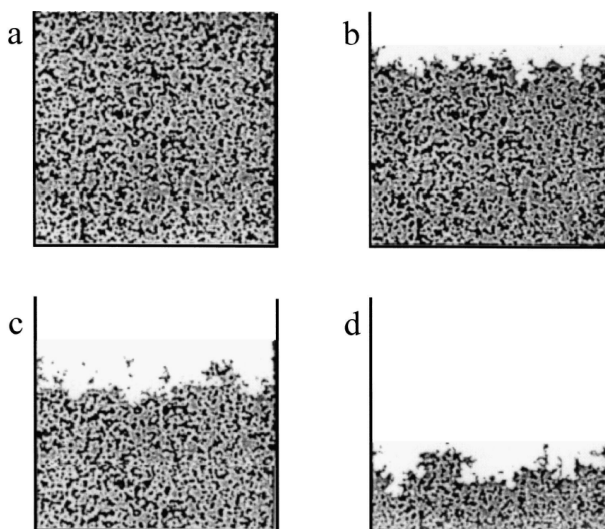


Figura 2.14: Simulación de un modelo basado en Monte Carlo de la liberación de un fármaco desde un CRS de superficie erosionable [15].

La formulación de éstos modelos ha ayudado a ampliar el entendimiento de los fenómenos que están involucrados en la liberación de fármacos desde matrices biodegradables. Pero nuevamente, la desventaja de estos modelos es que se enfocan en la descripción de los fenómenos ocurridos al interior del dispositivo, incluso aumentando el nivel de complejidad del modelo con este propósito, lo que dificulta el estudio que se pueda hacer de lo que ocurre con el fármaco liberado.

De este modo, estos trabajos previos han fundado una base sólida para la descripción de fenómenos en sistemas biodegradables, las ecuaciones presentadas corresponden a reacciones específicas, lo que sugiere que sólo son válidas para específicos sistemas poliméricos. Además, las ecuaciones han sido resueltas para casos simples de una dimensión.

Considerando lo anterior, se definen los objetivos general y específicos del presente trabajo:

## **2.5. Objetivos**

### **2.5.1. Objetivos Generales**

El objetivo del presente proyecto es el diseño de una membrana biodegradable de ácido poliláctico (PLA) que permita encapsular y luego liberar antibiótico en forma controlada y prolongada para el tratamiento de infecciones recurrentes como es el caso de otitis media aguda.

Se busca que el diseño de la membrana resulte óptimo en cuanto al perfil de concentración de antibiótico en función del tiempo mediante el análisis de la fenomenología relevante que forma parte de este sistema y al posterior desarrollo de un modelo físico-químico que permita determinar las características ideales del dispositivo con el fin de que cumpla con estos requisitos.

### **2.5.2. Objetivos Específicos**

- Identificación de los fenómenos físico-químicos relevantes en el proceso de liberación.
- Desarrollo del modelo fenomenológico para la liberación y degradación.
- Estudios experimentales de liberación de antibiótico para distintas características de diseño.
- Ajuste del modelo en base a datos experimentales y definición de las características óptimas del sistema.

# Capítulo 3

## Metodología

### 3.1. Metodología General

Para la ejecución de este trabajo fue necesario realizar algunos cambios en los protocolos elaborados anteriormente por Fernando Vera [16], teniendo en cuenta las observaciones realizadas en su memoria y a las nuevas condiciones que se estudiaron en este caso, como es el estudio de la liberación de ampicilina desde membranas sintetizadas con un PLA de menor peso molecular que el usado anteriormente. Entre los protocolos que no sufrieron de cambios con respecto al trabajo anterior es la Preparación de *Buffer* Fosfato; los protocolos rediseñados corresponden a la Experiencia de degradación de ampicilina en presencia de bacterias, Síntesis de membranas de PLA (PDL04) cargadas con ampicilina y Cuantificación de las muestras; mientras que aquellos que fueron elaborados en este trabajo corresponden a la Síntesis de membranas de PLA (PDL02) cargadas con ampicilina.

Esta memoria se encontró dividida en dos partes. Una primera etapa de modelamiento, la cual se encuentra descrita en la Figura 3.1. Aquí, la implementación del modelo fue realizado en COMSOL Multiphysics y concluye con la determinación de los parámetros de diseño de las membranas de PLA cargadas con ampicilina. Los datos para ajustar el modelo se obtuvieron en una segunda parte experimental, descrita en la Figura 3.2, para la cual se sintetizaron 5 tipos de membranas que se diferencian en espesor y peso molecular promedio de PLA, y fijan como parámetro la concentración inicial de ampicilina en un 10% *p/p* con respecto a la masa del polímero. El detalle de estas membranas encuentran descritas en la Tabla 3.1.

La elección de fijar esa concentración inicial de ampicilina se debe a que, de las concentraciones utilizadas por F. Vera [16] en su trabajo, el 10% de ampicilina como concentración inicial es el valor más cercano utilizado por Goycoolea [31], que corresponde a un 12%. Por otro lado, según los datos obtenidos por F. Vera (Figura 3.3) se observa que para las membranas de 0,05 y 0,1 mm y carga inicial de 10% y 5%, respectivamente, alcanzan concentraciones mayores de ampicilina, mientras que la membrana 0,33 mm y 2% de ampicilina inicial tiene un perfil con concentraciones del antibiótico más bajas, pero al mismo tiempo más estables. Esto último puede deberse a que el espesor de la membrana

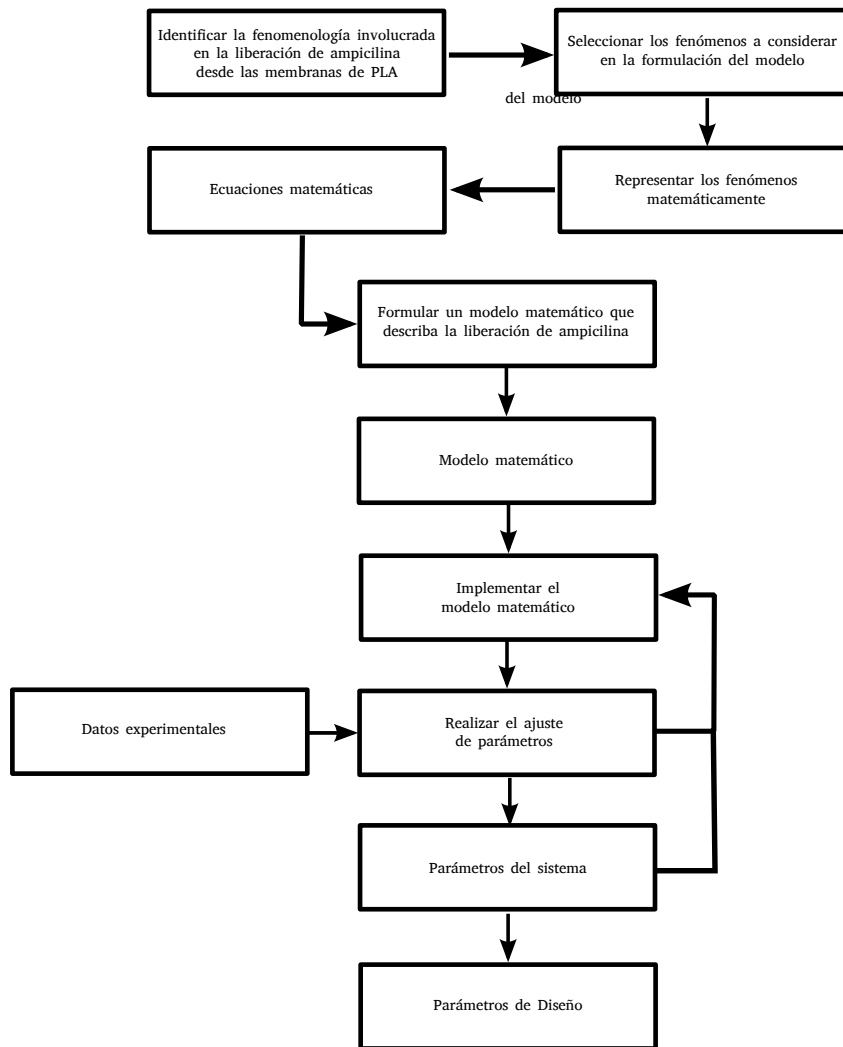


Figura 3.1: Metodología para la etapa de modelamiento.

controla con mayor fuerza la liberación de la ampicilina al representar una mayor resistencia al transporte del antibiótico. De este modo, sería deseable que esta configuración, con un perfil que se mantiene constante en el tiempo, lograra concentraciones de antibiótico mayor, por lo que aumentar la concentración inicial de las configuraciones a un 10% resulta ser pertinente para el estudio.

## 3.2. Materiales y equipos

Los materiales y equipos más importantes se destacan a continuación. Los reactivos y materiales de laboratorio se detallan en Anexo.

- **Polímero:** Se utilizó PLA Purasorb PDL 04 (I.V. 0,4 dL/g y densidad 1,25 g/cm<sup>3</sup>) y PDL02 (I.V. 0,2 dL/g y densidad 1,25 g/m<sup>3</sup>) fabricados por Purac Biomaterials.

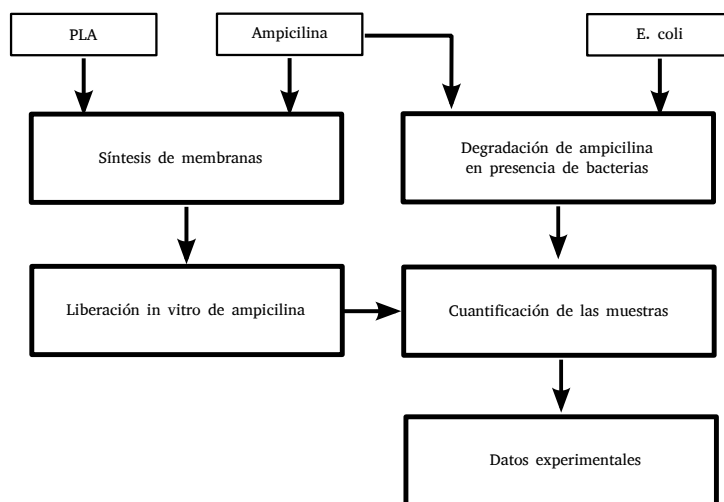


Figura 3.2: Metodología para la parte experimental

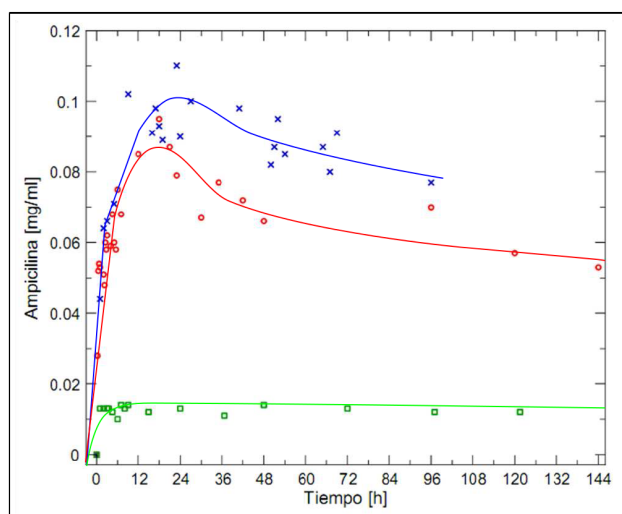


Figura 3.3: Datos de liberación de ampicilina desde membranas de PLA obtenidos por F. Vera en su Memoria de Título [16].

- **Antibiótico:** Ampicilina trihidratada en polvo, Sigma Aldrich (n° de catálogo A6140-5G).
- **Columna cromatográfica C-18:** Se utilizó como fase estacionaria en el sistema RP-HPLC. Es una matriz de sílice (tamaño 5 m) modificada con grupos hidrofóbicos octadecil (cadenas alifáticas de 18 carbonos). El nombre comercial de la matriz es LiChrospher 100 RP-18, empacada en una columna de acero inoxidable de 125 x 4 mm (LiChroCART). El fabricante es Merck y su número de catálogo es 1.50823.
- **Equipos:**
  - Cromatografía HPLC (High pressure liquid chromatography). El equipo que se utiliza es de SHIMADZU y es un sistema moderno que optimiza los resultados de un sistema HPLC convencional. Posee un sistema de cuatro bombas peristálticas (LC-20AB), de las cuales se utiliza sólo una; un horno con ventilador (CTO-20AC) para mantener la temperatura de la columna constante; un detector UV

Tabla 3.1: Características de las membranas sintetizadas en este trabajo.

I.V.[dL/g]	Carga ampicilina [g]	Espesor [mm]
0,4	0,234	0,1
0,4	0,772	0,33
0,2	0,117	0,05
0,2	0,234	0,1
0,2	0,772	0,33

(SPD-20AV), que se utiliza a 225 nm; y además posee un muestreador automático (SIL-20AC) con una bandeja temperada a 4°C para poner un máximo de 70 muestras. Las distintas partes del equipo son dirigidas por un controlador (CBM-20A). La comunicación entre el equipo y el usuario se realiza mediante el software LCsolution Workstation.

- Incubadora de laboratorio con ventilador, GALLENKAMP. Su temperatura se mantiene fija en 37°C.
- Congelador SO-LOW. Su temperatura se mantiene alrededor de -70°C.
- Computador con procesador Intel Core 2 Duo con 2G de memoria RAM.

### 3.3. Metodología experimental

#### 3.3.1. Evaluación de degradación de ampicilina en presencia de bacterias

Debido a la acción bactericida de la ampicilina es que se espera que la degradación de este antibiótico sea más rápida que debido a una pura reacción de hidrólisis. Es por esto que se midió la velocidad de degradación de la ampicilina en presencia de *E. coli* como organismo modelo de la infección que produce la OMA.

La elaboración de este protocolo se hizo en base al documento de EUCAST para la determinación del MIC de *E. coli* [53], de donde se obtuvo que la concentración de bacterias utilizadas en estos estudios es de  $5 * 10^5$  CFU/mL y además de la concentración del antimicrobiano determinada en 8mg/L [54]. Esto se hizo con la finalidad de poder obtener concentraciones en las que se pudiera observar la acción de las bacterias ante la ampicilina y viceversa, sin que una sobrepase a la otra, ocasionando que no se observe ningún efecto.

Por otro lado, debido a que no fue posible elaborar una curva de calibración O.D. v/s CFU/mL para cepa *DH5 $\alpha$*  utilizada para este estudio, es que se utilizó una curva desarrollada para la cepa de *E. coli*  $\alpha$ -select gold standard de Bioline [55], que es directamente comparable



con la cepa *DH5α* [56]:

$$y[CFU/mL] = 10^8 * x[O.D.] \quad (3.1)$$

El protocolo de esta experiencia se encuentra en Anexos A (Protocolo N°1).

### 3.3.2. Preparación de *buffer* fosfato

El *buffer* fosfato al 0,01 M es la solución utilizada en este y otros trabajos similares debido a que se asemeja a las condiciones fisiológicas del cuerpo humano. Además el pH de esta solución fue ajustada a 7 para asemejar las condiciones neutras del oído medio.

El protocolo de elaboración de esta solución se encuentra en Anexos A (Protocolo N°2).

### 3.3.3. Uso y almacenamiento de PLA

Debido a que el PLA es un polímero higroscópico, es decir que absorbe humedad, y a que su degradación es por hidrólisis es que se debe tener precaución con su uso y almacenamiento. Esto se encuentra descrito en Anexos A (Protocolo N°3).

### 3.3.4. Síntesis de membrana de PLA (PDL04) cargadas con ampicilina

El protocolo utilizado para la elaboración de membranas hechas de PDL04 es el mismo que fue diseñado por F. Vera en su memoria de Título [16]. Este consiste en disolver los gramos de PLA necesarios para lograr un espesor de membrana en diclorometano, para luego agregar la ampicilina. Una vez lograda una solución homogénea, ésta se vierte en una placa de Petri cubierta previamente con teflón y se espera a que se evapore el solvente, de lo cual se debe obtener un delgado *film* translúcido y cargado con ampicilina. Debido a la superficie de teflón, retirar la membrana de la placa de petri resulta bastante sencillo. Una vez retirada la membrana, ésta se corta cuidadosamente en cuadrados de 1 cm x 1 cm con un bisturí y se almacenan a 4°C.

Este proceso se utilizó para sintetizar membranas de 2 espesores diferentes: 0,1 y 0,33 cm. El protocolo se encuentra descrito más detalladamente en la sección de Anexos A, Protocolo N° 3.

Este método, también conocido como *solvent casting*, es uno de los más sencillos y rudimentarios para la manipulación de polímeros. Sin embargo, presenta un gran potencial para aplicaciones de PLDLA *in vivo* [10].

### 3.3.5. Síntesis de membrana de PLA (PDL02) cargadas con ampicilina

Debido a que PDL02 tiene un bajo peso molecular es que presentó características distintas al PDL04, como un mayor tiempo de evaporación del solvente y una mayor fragilidad que dificultó el retiro desde las placas. Por esta razón es que fue necesario realizar modificaciones al protocolo para así poder trabajar con este polímero. Entre los cambios que se efectuaron fue el adicionar carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ) en una relación de un 20 % *p/p* de los gramos de PLA utilizados con el fin de aumentar la elasticidad de la membrana [57]. Cabe recalcar, que la adición de  $CaCO_3$  aumenta la elasticidad, es decir aumenta el módulo de Young del polímero, pero al mismo tiempo aumenta su rigidez flexural (aumenta su módulo elástico axial). En otras palabras, el polímero se vuelve mucho más frágil, pero es posible desprenderlo de la placa sin que sufra deformaciones.

Por otro lado, la presencia de  $CaCO_3$  aumenta la porosidad del PLA, por lo que se espera que la difusividad efectiva se vea aumentada por esto. Además, fue necesario variar la cantidad de diclorometano utilizado ya que PDL02 no requiere de tanto solvente ni tiempo de disolución, pero al mismo tiempo es necesario que la solución PLA- $CaCO_3$ -ampicilina cubra por completo la superficie de la placa Petri.

### 3.3.6. Experiencia de liberación de ampicilina

El protocolo realizado en esta experiencia es el mismo desarrollado por F. Vera [16] el cual consistió en introducir membranas de un mismo espesor y tipo de PLA en tubos Falcon de 50 mL (una membrana en cada tubo), para luego adicionar 5 mL de PBS en cada uno de ellos, teniendo cuidado de que las membranas queden sumergidas en el *buffer*. Cada set de tubos fue colocado en un shaker sin agitación con una temperatura de 37°C. Cada cierto tiempo se fue retirando 3 tubos, se le sacaba la membrana y se obtenían 2 muestras de cada tubo de 1 mL cada una, dando un total de 6 muestras como se muestra en la Figura 3.4. Las muestras eran almacenadas a -70°C para evitar una posterior degradación de la ampicilina.

La recolección de muestras duró 7 días mostrándose un detalle del procedimiento en el Anexo A (Protocolo N°5).

### 3.3.7. Cuantificación de las muestras experimentales

Para determinar la cantidad de ampicilina en las muestras recolectadas en la evaluación de degradación y las experiencias de liberación de ampicilina se utilizó un sistema de RP-HPLC con elusión isocrática diseñado en el trabajo realizado por F. Vera [16], el cual a su vez está basado en el trabajo de J.B. Lee y colaboradores [58]. En este protocolo se utiliza una columna C 18, un *buffer* de elusión isocrático compuesto por una solución de  $KH_2PO_4$  0,01M:acetronitrilo:metanol = 70:19:11 (v/v) y un detector UV a 224 nm.

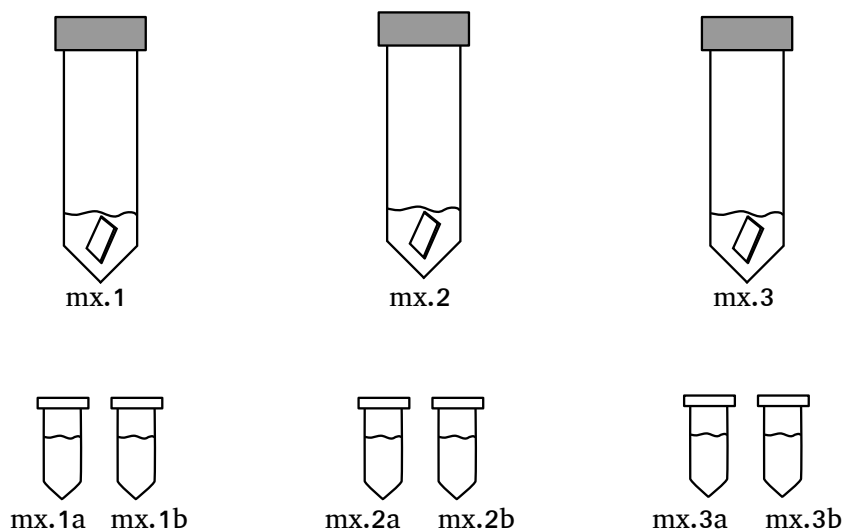


Figura 3.4: Diagrama de toma de muestra para un punto x.

Lo primero fue la construcción de las curvas de calibración que relacionara el área del peak medido por el RP-HPLC con la concentración de ampicilina en las muestras, para lo cual se prepararon muestras en duplicado con distintas concentraciones conocidas, de las cuales se inyectaron  $50 \mu L$  de cada una. El análisis de las muestras se lleva a cabo en forma automatizada por el equipo de HPLC, para lo cual sólo es necesario preparar las muestras a medir. Se debe escoger un máximo de 70 muestras por *batch* que se deben retirar del congelador a  $-70^{\circ}C$ , para ser descongeladas, filtradas y puestas en viales con sus respectivos *caps* y *septums*. Cada vial es puesto en la bandeja del muestreador del equipo y se define en su *software* el programa para el orden y volumen de muestreo a inyectar. Las condiciones de operación del HPLC son las siguientes:

- Fase móvil:  $0,01 M KH_2PO_4 : CH_3CN : CH_3OH$  (70:19:11).
- Velocidad del flujo:  $0,4 mL/min$ .
- Temperatura:  $25^{\circ}C$ .
- $\lambda_{max}$  :  $225 nm$ .
- Volumen inyectado:  $50 \mu L$  por muestra.
- Tiempo de inicio :  $0.00 min$
- Tiempo de detención:  $6.00 min$

Al terminar de usar la columna, ésta se debe lavar con una solución de acetonitrilo: agua (20:80 v/v). Un detalle de los protocolos aquí descritos se pueden encontrar en Anexo A (Protocolo N°5).

## **3.4. Metodología de modelamiento**

### **3.4.1. Comprender el sistema**

En primer lugar fue necesario comprender el sistema PLA-ampicilina para construir una idea de los fenómenos que podrías ocurrir en éste. De esta forma, se estudió cuales eran las características y propiedades de PLA como matriz contenedora del fármaco, de la misma forma que se recopiló información sobre características y mecanismos de acción de la ampicilina.

Cabe mencionar que afortunadamente se contaba con un set de datos experimentales de liberación de este sistema, lo que ayudo a la comprensión y al replanteamiento de los fenomenología que podría estar involucrada.

### **3.4.2. Identificar la fenomenología**

El segundo paso en el modelamiento matemático fue el estudio del sistema que se desea describir mediante ecuaciones matemáticas. Debido a que se desea llegar a un modelo físico-químico es que este paso consistió en la identificación de los fenómenos relacionados con la liberación de un soluto desde una matriz polimérica. Este proceso consistió principalmente en la búsqueda de información sobre los mecanismos de liberación de fármaco en libros y revistas científicas. Como se puede observar en la lista de la sección 2.3, el número de fenómenos que pueden estar presentes en estos sistemas son muchos y muy variados, siendo además algunos más relevantes que otros, por lo que una posterior etapa de selección de fenómenos fue necesaria.

### **3.4.3. Seleccionar los fenómenos a considerar en la formulación del modelo**

Una de las claves en la selección de los mecanismos relevantes en el sistema fueron los datos encontrados en literatura, en los cuales se describe cuales fueron los fenómenos considerados inicialmente, por ser los más básicos, y cuales otros han sido incorporados a nuevos modelos con el fin de conseguir resultados más acorde a la realidad.

Por otro lado, otro factor importante en esta selección fueron los datos experimentales y resultados obtenidos por F. Vera [16], los cuales permiten inferir cuales de los mecanismos listados para estos sistemas son los que están presentes o son los más influyentes.

### **3.4.4. Representar los fenómenos mediante ecuaciones matemáticas**

La formulación del modelo requiere de las ecuaciones matemáticas que representan los fenómenos seleccionados, las cuales fueron obtenidas de leyes y teorías sobre la cinética de dichos fenómenos. Para todo esto fueron utilizados los conocimientos y competencias adquiridos durante la formación profesional.

### **3.4.5. Formulación del modelo**

La definición de las variables que describen el estado de un sistema y las ecuaciones que describen como éstas van cambiando en función del tiempo es un paso necesario en el modelamiento matemático.

En el caso del sistema de PLA-ampicilina, una variable de estado correspondió a la concentración del antibiótico, y las ecuaciones de estado se obtuvieron al relacionar la variable a principios de transporte y conservación de masa. Por otro lado se encuentra la difusividad efectiva de un soluto en el polímero debido a efectos de la degradación de éste, la cual se relacionó con la cinética asociada a la disminución del peso molecular promedio de PLA.

Finalmente, debido a la geometría del sistema desde donde se obtienen los datos experimentales, se consideró suficiente la construcción de un modelo en 1 dimensión para simular la liberación de ampicilina desde las membranas de PLA y que cumple los propósitos para el procedimiento que se describe a continuación.

### **3.4.6. Ajuste de parámetros**

Este procedimiento se realizó variando los valores de los parámetros del modelo para posteriormente ir obteniendo simulaciones de la liberación de ampicilina y ser comparada con los datos experimentales. Este paso es necesario debido a que no se conocen valores de los parámetros sistema, como la difusión de la ampicilina en PLA, el perfil de concentración del antibiótico en la membrana en un estado inicial, o la velocidad de degradación del polímero.

Debido a que COMSOL no posee un módulo de optimización aplicado al módulo de Transporte de Especies Diluidas, es que no se pudo realizar una optimización de estos parámetros.

### **3.4.7. Diseño óptimo**

A partir de los parámetros determinados en la etapa anterior, se busca determinar el diseño óptimo del dispositivo con tal que presente un perfil deseado de liberación de ampicilina.

# Capítulo 4

## Resultados y Discusiones

### 4.1. Resultados Experimentales

A continuación se presenta una descripción y análisis de las membranas sintetizadas, las curvas de calibración entre la absorbancia y la masa de ampicilina, los datos experimentales de la velocidad de degradación de ampicilina en presencia de bacterias y los datos experimentales sobre la experiencia de liberación *in vitro* de ampicilina desde membranas de PLA de distinto espesor (0,05; 0,1 y 0,33 mm) y de distinto peso molecular (PDL02 y PDL04).

#### 4.1.1. Síntesis de membranas

El primer paso consistió en la elaboración de membranas de PLA que fueran capaces de entregar datos experimentales que fueran complementarios a los proporcionados en el trabajo realizado por F. Vera [16], los cuales corresponden a los que se muestran en la Tabla 4.1. En este trabajo el autor fabricó membranas de PLA con viscosidad inherente igual a 0,4 dL/g (PDL04), de 1cm x 1cm y de 3 espesores de membrana distinto, fijando como parámetro la cantidad inicial de ampicilina en las membranas (0,117 g), lo cual se traduce en que la concentración del antibiótico dentro del polímero sea distinto para cada caso.

Tabla 4.1: Datos de liberación de ampicilina desde membranas de PLA obtenidos por F. Vera.

I.V. [dL/g]	Espesor [mm]	Ampicilina [%p/p]
0,4	0,05	10
0,4	0,1	5
0,4	0,33	2

Considerando que el transporte de masa en condiciones de no-convección se rige, generalmente, por la diferencia de concentración es que se planeó la realización de los siguientes experimentos de liberación (Tabla 4.2):

Tabla 4.2: Datos de liberación de ampicilina desde membranas de PLA obtenidos en el presente trabajo.

id.	I.V. [dL/g]	Espesor [mm]	Ampicilina [%p/p]
PDL04-01	0,4	0,01	10
PDL04-033	0,4	0,33	10
PDL02-005	0,2	0,05	10
PDL02-01	0,2	0,01	10
PDL02-033	0,2	0,33	10

En este caso, se fijó el parámetro de la concentración inicial de ampicilina en el polímero, dejando como variables el espesor de las membranas y el peso molecular del PLA. Esto último con el fin de estudiar la influencia del peso molecular promedio del polímero en la difusión del soluto.

Sin embargo, en el caso de las membranas elaboradas a partir del polímero de I.V. igual a 0,2 dL/g (PDL02), inicialmente se obtuvieron membranas que resultaron ser muy frágiles y poco flexibles como para poder ser desprendidas y manipuladas, por lo que se optó por adicionar carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ) a la solución del *solvent casting* debido a que se ha demostrado que este compuesto aumenta la flexibilidad del PLA [57]. La proporción utilizada para todos los casos correspondió a un 20 %p/p en relación a la masa de polímero, ya que ésta es la cantidad más baja reportada que tiene un efecto en aumentar la flexibilidad del polímero. Sin embargo, cabe destacar que  $CaCO_3$  también aumenta la porosidad del PLA, por lo que también aumenta su densidad, siendo estos los factores a considerar en el análisis de los datos experimentales de liberación de ampicilina para estos casos.

Por otro lado, se incluyó el uso de bases de teflón lo que facilitó el desprendimiento de las membranas en comparación a la superficie de vidrio de las placas de Petri. Además, este paso se ve aún más facilitado si las membranas se encuentran a 4°C, por lo cual se incluyó esta condición en el protocolo. De esta forma, se obtuvieron las membranas que a simple vista presentaron una distribución homogénea de ampicilina como se observa en la Figura 4.1, siendo las de PDL04 translúcidas y PDL02 opacas por la presencia de  $CaCO_3$ .

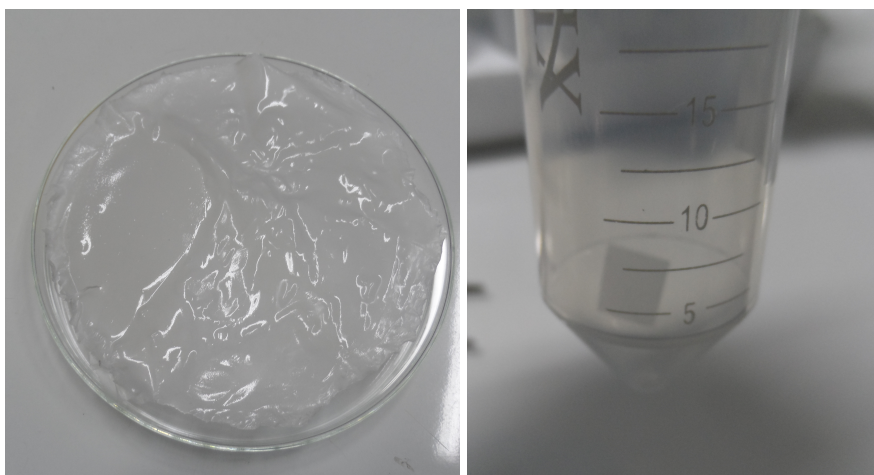


Figura 4.1: A la derecha, resultado de despegar la membrana desde la placa Petri con base de teflón. A la izquierda, membrana de 1cm x 1cm en su tubo Falcon.

#### 4.1.2. Curva de calibración

La construcción de la curva de calibración permitió relacionar la cantidad de absorbancia medida por el RP-HPLC con la masa de ampicilina presente en el volumen inyectado. Para esto se inyectó un volumen definido de distintas concentraciones conocidas de soluciones *buffer* fosfato-ampicilina. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.2.

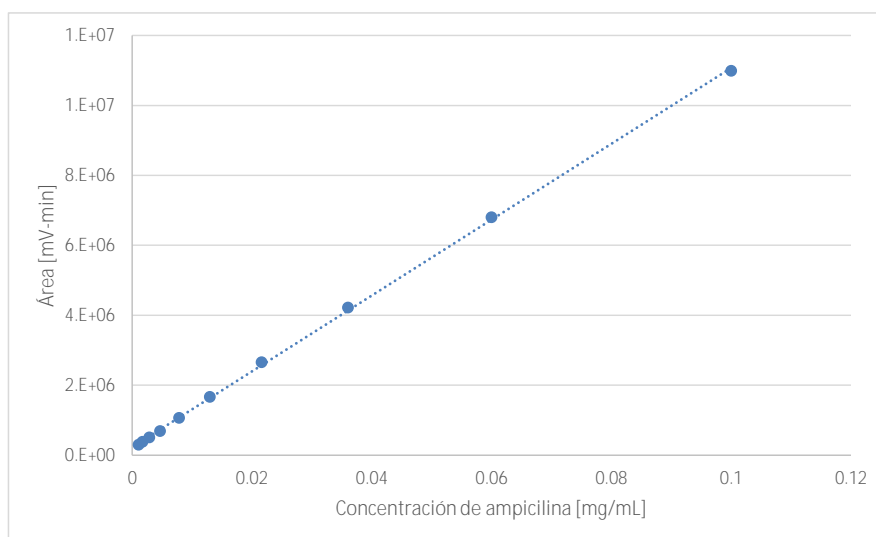


Figura 4.2: Curva de calibración de concentración de ampicilina en *buffer* fosfato.



Al hacer una regresión lineal de los datos se obtuvo la siguiente ecuación con un  $R^2 = 0,9998$ :

$$y[mV - min] = 108465830.9 \cdot x[mg/mL] + 228563.0117 \quad (4.1)$$

Debido a que el coeficiente de determinación es muy cercano a 1, es posible concluir que el ajuste fue bueno.

Sin embargo, cabe mencionar que la curva de calibración obtenida en este trabajo difiere en un grado de magnitud de la que obtuvo F. Vera en su trabajo [16]. Esto se puede deber a que la forma en la que se realizó la curva fue distinta en ambos casos: mientras F. Vera midió la masa de ampicilina de distintos volúmenes de una misma concentración, en este trabajo se midió la masa de distintas soluciones preparadas mediante diluciones de un stock inicial.

De esta forma, los errores que podrían estar asociados a la diferencia de las curvas de calibración obtenidas en ambos trabajos estarían asociados a la preparación de las muestras a medir: como al pesar la cantidad de ampicilina necesaria para preparar la solución, la cantidad de *buffer* fosfato añadido para preparar y diluir las soluciones, o el tiempo que demora el filtrado de muestras durante el cual es posible que ocurra degradación de ampicilina.

Por otro lado, también pueden existir errores en la medición por parte del RT-HPLC, el cual se puede deber a diferencias de elaboración del *buffer* utilizado y que repercutan en una variación de la medición por parte del equipo. Debido a esto es que se sugiere realizar una curva de calibración cada vez que se utilice un nuevo *buffer*.

### 4.1.3. Degradación de ampicilina en presencia de bacterias

A pesar de que se realizó el experimento para medir la velocidad de degradación de ampicilina en presencia de *E. coli*, los datos obtenidos de la medición de ampicilina del cultivo no son útiles para este propósito. Esto debido a que, como se ve en la Figura 4.3, el *peak* obtenido para todas las muestras de cultivo tiene una forma distinta a la observada en las muestras de *buffer* fosfato con ampicilina, además de alcanzar valores muchos más altos de lo esperado considerando que la concentración del antibiótico en el cultivo inicial es de  $0,064 mg/mL$ , y que la concentración máxima con la que fue construida la curva de calibración es de  $0,1 mg/mL$ .

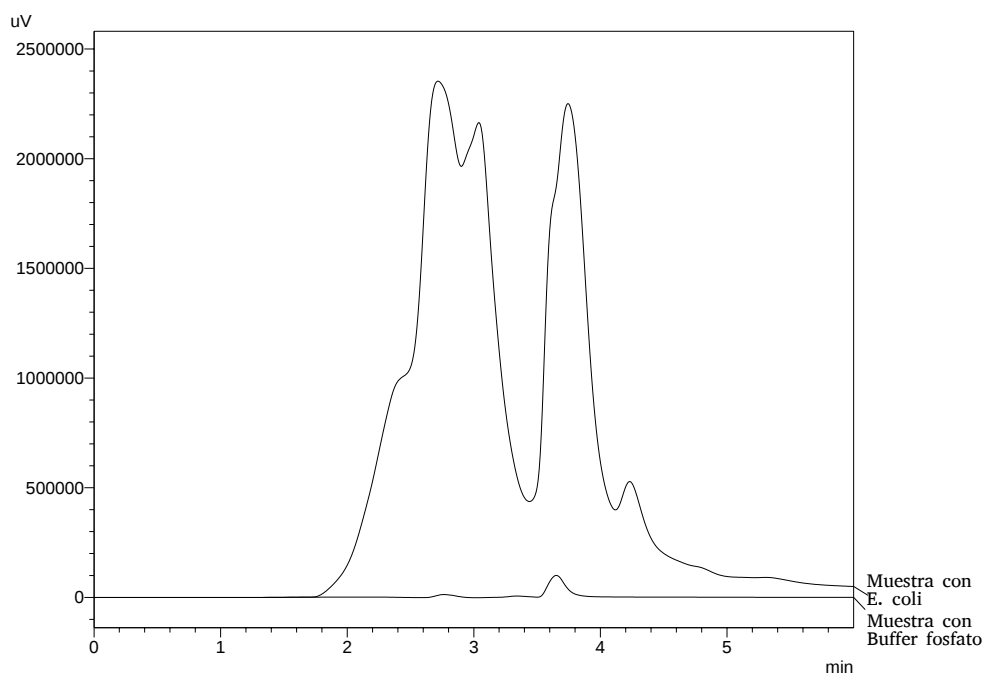


Figura 4.3: Comparación de los *peaks* obtenidos para una muestra del cultivo con *E. coli* y *buffer* fosfato con ampicilina.

Debido a lo anterior es que se concluye que el medio LB en donde se realizó el experimento contiene compuestos que fueron detectados por el sistema de medición, llegando incluso a ocultar la curva que podría corresponder a la de ampicilina en ese medio. Por esto que se sugiere realizar una segunda versión del experimento con un medio mínimo de LB para el crecimiento de bacterias, para que de esta manera los componentes del medio de crecimiento no interfieran en con la medición de ampicilina.

#### 4.1.4. Liberación *in vitro* de ampicilina

En esta parte, se siguió el diseño experimental desarrollado anteriormente con el fin de registrar las variaciones de concentración de ampicilina en un volumen de 5 mL de PBS 0,01M, pH 7 y 37°C, por efecto de la liberación del antibiótico desde una membrana de PLA. Cabe mencionar que cada *set* de experimentos se realizó por triplicado, y se tomaron 2 muestras de cada uno por punto de medición.

Para el tratamiento de los datos los criterios utilizados fueron:

1. Se eliminaron aquellos datos que presentaron un peak anormal en el diagrama entregado por el equipo de RT-HPLC.
2. Se prestó atención a aquellos puntos en que la Desviación Estándar Relativa fuera mayor a un 20%.

3. De aquellos datos se comprobó que los datos que provenían de un mismo tubo fueran similares. De no ser a así, se convertían en candidatos a ser descartados.
4. Se busca cuales de los triplicados presenta un valor distinto a los dos otros, y éste era eliminado con el fin de disminuir la desviación estándar del punto.
5. Si todos los triplicados presentaban valores visiblemente distintos, se procedía a eliminar dos de ellos teniendo en consideración la tendencia de sus puntos vecinos.
6. Finalmente, fueron eliminados los *outliers* bajo inspección visual.

A continuación, se muestran los resultados para PDL04-01 y PDL04-033, obtenidos en este trabajo. Los datos completos se encuentran en Anexos C.

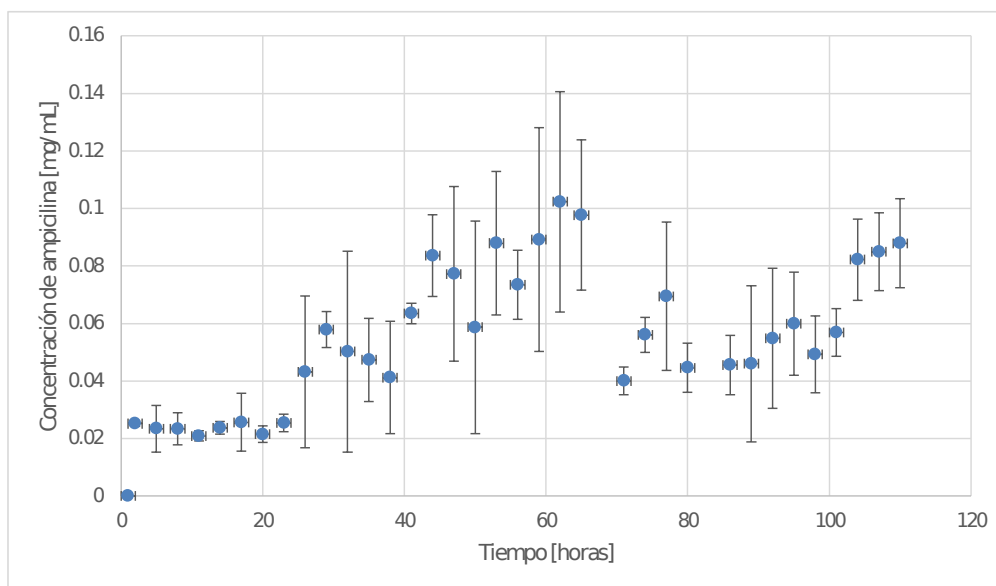


Figura 4.4: Resultados de la experiencia de liberación para PDL04-01.

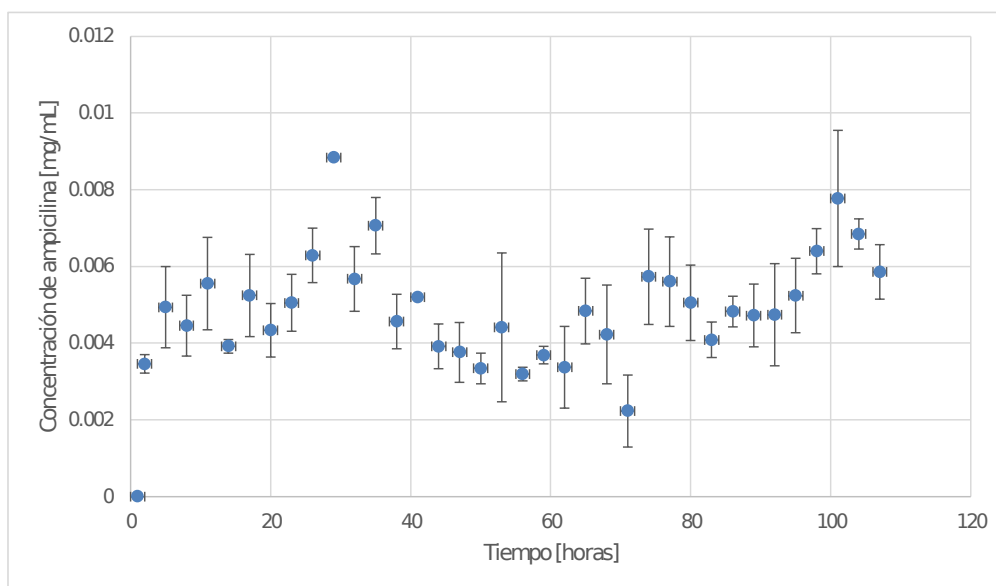


Figura 4.5: Resultados de la experiencia de liberación para PDL04-033.

En este trabajo no se realizó el experimento para PDL04-005 debido a que estos datos habían sido obtenidos anteriormente por F. Vera [16].

Los resultados de los perfiles de liberación para PDL02-005, PDL02-01 y PDL02-033 se muestran a continuación en las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8:

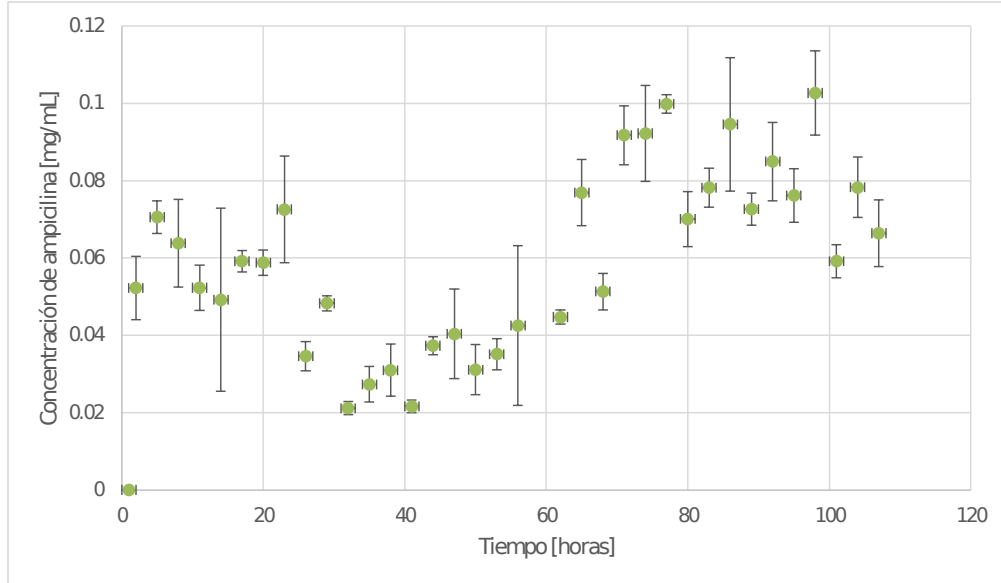


Figura 4.6: Resultados de la experiencia de liberación para PDL02-005.

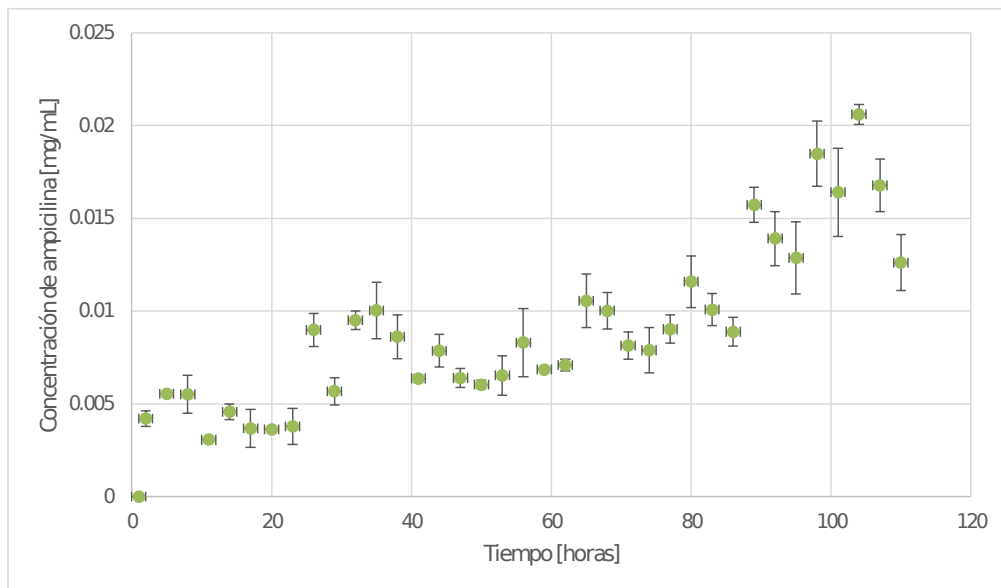


Figura 4.7: Resultados de la experiencia de liberación para PDL02-01.

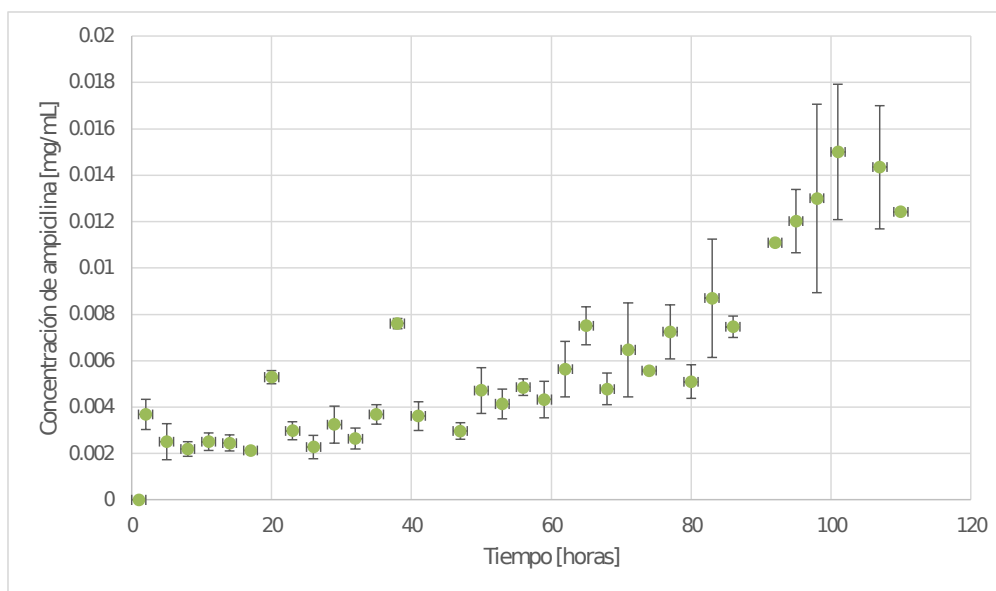


Figura 4.8: Resultados de la experiencia de liberación para PDL02-033.

Los datos en ambos polímeros presentan fluctuaciones que pudieron ser producidos por variados tipos de error en distintas partes de la etapa experimental. En la etapa de síntesis de membranas, los errores detectados fueron:

1. A pesar de que visualmente las membranas se veían con una distribución homogénea de ampicilina, la variación de datos obtenidos de los triplicados, y que en parte se ve en la desviaciones estándar en los gráficos, muestran que en realidad la concentración de la membrana obtenida era heterogénea. Si bien se observó una mejoría en cuanto a esta característica en comparación a lo que obtuvo F. Vera [16] en su trabajo, esto no es suficiente como para garantizar un producto que pudiera tener un uso médico. Una forma de solucionar este problema sería el de aumentar la cantidad de solvente al momento de preparar la solución de PLA-ampicilina-DCM, con tal de asegurar una buena disolución de los solutos. Sin embargo, esto aumentaría el tiempo de secado que debe tener esta solución una vez vertida en la placa de Petri.
2. Lo descrito anteriormente es otra fuente de error identificada durante el proceso de síntesis de membrana. Durante el tiempo de secado, que es de al menos 1 hora, que requieren las membranas puede ocurrir la degradación de ampicilina. Esto se podría solucionar realizando la evaporación a baja temperatura y utilizando una presión negativa que aumente la velocidad de evaporación del solvente.
3. También es posible observar que la membrana de mayor espesor presenta desviaciones estándar menores que la membrana más delgada. Esto se podría deber a que la membrana de mayor espesor presenta una mayor resistencia al transporte de ampicilina hacia el medio acuoso, y por lo tanto genera un mayor control de la cantidad del antibiótico que es liberada. De este modo, esta resistencia disminuiría el efecto que podría ocasionar diferentes concentraciones iniciales en los triplicados.

Por su parte, los errores de experimentación que pueden ocurrir en el proceso de Liberación *in vitro* son:

1. En esta etapa es necesario adicionar *buffer* fosfato a una gran cantidad de tubos, acto que en teoría inicia el proceso de liberación y degradación de ampicilina desde las membranas. Debido a que el tiempo que toma agregar este *buffer* a todas las muestras es de aproximadamente 50 minutos, es que existe esta diferencia entre el momento en que se inicia estos fenómenos en el primer y último tubo al que se le agregó el *buffer*. Una forma de minimizar este error sería disponer de más experimentadores que ayuden al menos el primer día de este experimento.
2. Cabe mencionar que durante este proceso también se identificaron membranas que se encontraban flotando en el *buffer*, lo cual altera las condiciones de liberación de ampicilina. Esta es una condición difícil de remediar ya que se tuvo cuidado en asegurar que las membranas quedaran sumergidas al momento de adicionar el *buffer* y, sin embargo, éstas se encontraron flotando al momento de obtener la muestra.

Finalmente, al momento de preparar y cuantificar las muestras en el equipo de RT-HPLC, los errores que pueden ocurrir son:

1. El tiempo de preparación que requiere preparar cada *batch* de muestras para el poder ser usados en el equipo es de aproximadamente media hora para descongelar y de 1 hora para el filtrado. Durante este lapso se puede generar degradación de la ampicilina, que puede ser evitado si se cuenta con ayuda para el proceso de filtrado.
2. Por otra parte, existen diferencia por parte el equipo de RT-HPLC en la medición de la masa de una misma muestra, lo que es posible observar en algunos datos obtenidos. Para contrarrestar este hecho es que se realiza más de una medición de cada muestra.

A continuación se muestran una comparación de los perfiles obtenidos en cada tipo de PLA:

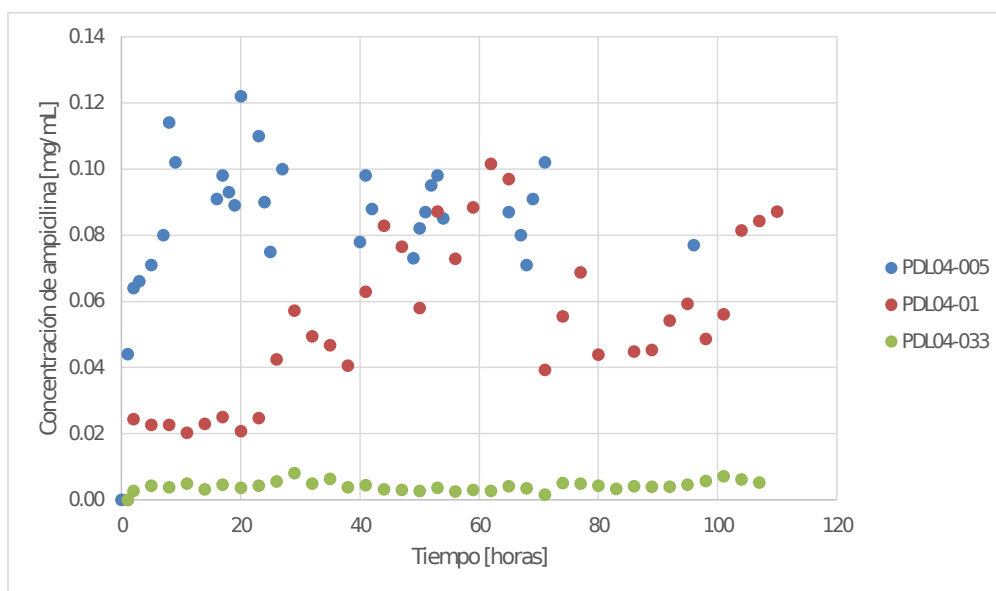


Figura 4.9: Comparación de los perfiles de liberación de membranas PDL04.

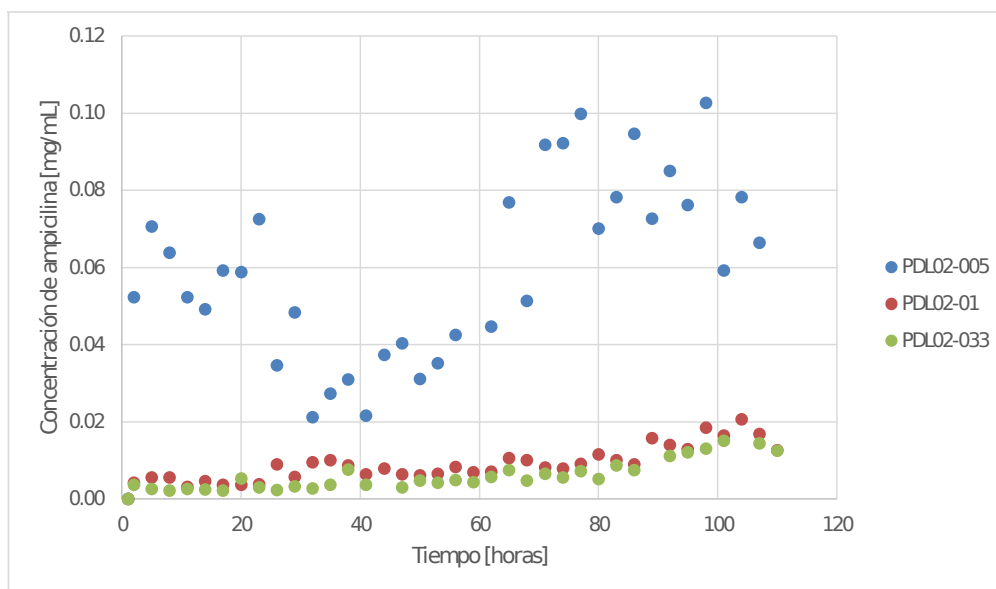


Figura 4.10: Comparación de los perfiles de liberación de membranas PDL02.

En la Figura 4.9 se muestran los dos perfiles de liberación obtenidas en este trabajo más el perfil obtenido por F. Vera [16]. Cabe recordar que las curvas de calibración obtenidas en ambos trabajos difieren en un orden de magnitud, como se explicó anteriormente. A pesar de que se contaban con los datos sin procesar de Vera, se optó por no tratar los datos con la curva de calibración obtenida en este trabajo debido a que esta diferencia se puede deber a que el *buffer* utilizado en ambos experimentos hayan sido levemente distintos, lo que pudo haber producido alteraciones en la medición.

En todos los casos es posible observar un aumento rápido de la concentración del antibiótico en el medio en estados iniciales del experimento, efecto del cual se habló anteriormente y que se conoce como *burst release*. En la Figura 4.9 se observa que para las membranas de 0,05 y 0,1 mm este efecto se mantiene incluso hasta después de las 20 horas, mientras que para la membrana de 0,33 mm es apenas perceptible en las primeras horas del experimento. Por su lado, en los resultados que se muestran en la Figura 4.10 la liberación explosiva es fuertemente perceptible para la membrana más delgada, y se observa levemente en las de mayor espesor.

En ambos gráficos se tiene que la concentración máxima alcanzada es mayor mientras más delgada es la membrana. Por otro lado, a diferencia de lo esperado, las membranas de PDL04 alcanzan concentraciones mayores que las de PDL02. Esto se puede deber a que el carbonato de calcio interfiere con la difusión de ampicilina, impidiendo su liberación al medio acuoso. Por otro lado, en la Tabla 4.3 se muestra que en todos los casos, la cantidad máxima de ampicilina en el medio acuoso, incluso después de la liberación explosiva, es menor a la cantidad dentro de las membranas. Lo anterior indica que después de ocurrido este fenómeno aún queda ampicilina en las membranas que puede ser liberada.

Finalmente, se observa que en el caso de los datos que se muestran en la Figura 4.9, la membrana más delgada presenta una leve disminución de concentración luego de alcanzar un

Tabla 4.3: Porcentaje de ampicilina liberado en la concentración máxima en el medio acuoso en relación a la masa total teórica en cada membrana.

id.	Porcentaje de ampicilina liberado [%]
PDL04-005	88,54
PDL04-01	36,87
PDL04-033	0,89
PDL02-005	74,01
PDL02-01	7,22
PDL02-033	1,57

punto máximo, mientras que la de espesor intermedio presenta un comportamiento errático que tiende a ir aumentando con el tiempo, y la de mayor espesor tiene un comportamiento más constante. Lo anterior puede ser explicado ya que la membrana más delgada ya ha perdido gran masa de ampicilina, por lo que posteriormente la cantidad de antibiótico que puede ir liberando cada vez es menor. La membrana de mayor espesor genera un mayor control sobre la liberación, por lo que sería capaz de mantener una concentración constante y por más tiempo, aunque más baja. La de espesor intermedio tiene un comportamiento difícil de explicar, sin embargo se espera que la masa de ampicilina dentro de la membrana después de la liberación explosiva es suficiente como para seguir liberando antibiótico al medio acuoso, y que al mismo tiempo el espesor de la membrana no genere una gran resistencia.

Por su lado, para los resultados de PDL02 que se ven en la Figura 4.10 se observa que en todos los casos los perfiles tienden a ir aumentando. Esto se puede deber a que pesar del carbonato de calcio, éste también se va liberando con el tiempo, dejando de ser un impedimento. De este modo, el hecho de que un menor peso molecular promedio del polímero permita una mayor difusión del soluto se hace presente con el tiempo.

## 4.2. Resultados de Modelamiento

### 4.2.1. Fenómenos identificados y seleccionados para la formulación del modelo

La elección de los fenómenos utilizados en la formulación del modelo se hizo a partir de información encontrada en bibliografía, como lo es la lista de fenómenos que pueden estar presentes en sistemas poliméricos y que se encuentran descrita en el Marco Teórico (Sección 2.3). Sin embargo, y como se dijo en esa sección, no todos los fenómenos ahí listados se encuentran predominantemente presentes en todos los sistemas, por lo que es necesario realizar una selección de éstos.

Por otro lado, a partir del estudio y los resultados experimentales obtenidos por F. Vera en su memoria de título, es posible analizar cuales son los fenómenos involucrados en la liberación de ampicilina.



De este modo, se descartó los efectos osmóticos e hinchamiento del polímero debido a que a pesar de poseer enlaces éster que pueden tener interacción con moléculas de agua, PLA está formado por cadenas alifáticas que le dan un carácter hidrófobo. Tampoco se consideran procesos de convección, debido a la ausencias de flujos del solvente, ni procesos de adsorción/desorción, ya que se considera que la ampicilina no forma enlaces ni reacciona con el polímero.

Por otra parte, no se encontró información sobre posible cristalización del fármaco o de productos de degradación en el sistema, ni tampoco sobre difusión de hidrógenos o hidroxilos desde el medio, por lo que no se considerarán en este trabajo.

En consecuencia, al igual que en el trabajo anterior es posible concluir que los principales fenómenos involucrados en el sistema PLA-ampicilina son:

- Difusión del fármaco
- Disolución del fármaco
- Difusión de la droga y/o productos de degradación del polímero dentro de los poros
- Ingreso de agua al dispositivo
- Creación de poros acuosos
- Acumulación de productos de degradación dentro de la matriz
- Cambios en los microambientes de pH dentro de la matriz polimérica debido a productos de degradación
- Efecto autocatalítico durante la degradación del polímero

Sin embargo, en el modelamiento desarrollado anteriormente sólo se consideró la difusión de la ampicilina a través de la matriz (no a través de los poros), además de la degradación de ampicilina, que no es un fenómeno de liberación. Adicionalmente, en este trabajo se pretende incluir el efecto de degradación del polímero con el fin de estudiar la liberación de ampicilina en el largo plazo. Como se vio en la Sección 2.2, este fenómeno es consecuencia del resto que se encuentra listado anteriormente. Además, se incluirá el efecto de la liberación explosiva debido a que fue un efecto observado en los datos experimentales mediante la imposición de una condición inicial de la concentración de ampicilina en el polímero no-homogénea.

#### 4.2.2. Formulación del modelo y ajuste de parámetros

Se consideró una matriz biodegradable de PLA cargada heterogéneamente con ampicilina, con una mayor concentración en la superficie de la membrana. Las moléculas de antibióticos podrían estar atrapadas tanto dentro de la red de polímeros (Punto 2 de la Figura 4.11) como depositadas entre los poros de la matriz (Punto 3 de la Figura 4.11), y no forma enlaces con el PLA.

Una vez introducidas las membranas en *buffer* fosfato, se supondrá que será liberada rápidamente la ampicilina que se encuentra en una zona superficial de la membrana, lo que generará el efecto de liberación explosiva, como se muestra en la Figura 4.11, punto 1.

Luego, comenzará la humectación de la matriz debido al ingreso de agua a través de los poros y microporos. El agua generará la degradación del PLA en forma homogénea, según lo explicado en la Sección 2.2. Esto tendría como efecto el ensanchamiento de los poros (aumento de la porosidad  $e$ ) y que estos formarían salidas cada vez más directas hacia el medio acuoso (disminución de la tortuosidad  $\tau$ ), lo que facilitaría la salida de ampicilina a medida que progresa la degradación de la matriz, como se indicó anteriormente en la Ecuación 2.11.

De este modo, el coeficiente de difusión efectiva dependerá del tiempo, teniendo como hipótesis que está relacionado con el peso molecular promedio, como lo indican las Ecuaciones 2.12 y 2.13.

Finalmente, una vez en el medio acuoso la ampicilina sufrirá una reacción de degradación por hidrólisis, siendo esta velocidad de degradación conocida a partir del trabajo de F. Vera [16].

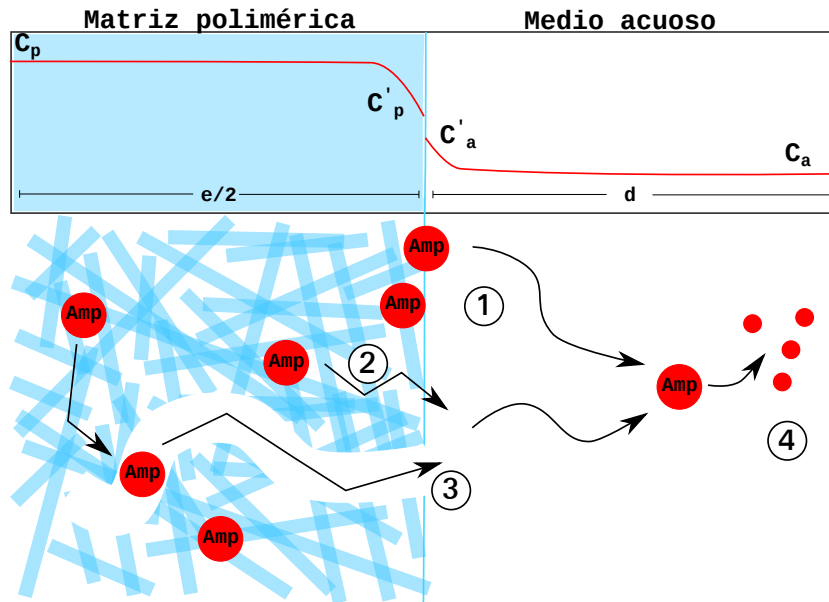


Figura 4.11: Fenómenos seleccionados para el modelamiento del sistema PLA-ampicilina.

## Iteración 1

La estrategia de implementación del modelo consistió en ir adicionando uno por uno las ecuaciones que describen los distintos fenómenos, con el fin de ir detectando con mayor facilidad los errores de modelamiento, además de ir corroborando el efecto de cada fenómeno en las simulaciones. De esta manera, el primero de ellos en implementarse fue la difusión mediante la Ecuación 4.2 para la descripción del fenómeno en el interior del polímero, y la Ecuación 4.3 para el medio acuoso.

$$\frac{dC_p}{dt} = -\nabla \cdot (D_p \nabla C_p) \quad (4.2)$$

$$\frac{dC_a}{dt} = \nabla(D_a \nabla C_p) + R \quad (4.3)$$

Como es posible observar, en ambas ecuaciones no existe el término convectivo ya que se considera que no hay flujos de corriente en ninguno de los dominios. Además, y como es de esperar, ambos poseen términos difusivos cuyos valores son distintos para ambos dominios, encontrándose que la difusión de ampicilina en medios similares al *buffer* fosfato es igual a  $D_a = 2,3 * 10^{-3} [m^2/s]$  [59].

Asimismo, cabe mencionar la presencia de un término de consumo (R) en el dominio del medio acuoso que representa la degradación de ampicilina por hidrólisis (Ecuación 4.4. Se consideró este fenómeno sólo en este dominio debido a que la cantidad de agua que penetra el PLA es no más de un 1% [60], por lo que al interior de la matriz no se darían las condiciones para que este antibiótico se degrade.

$$R = -k_{amp} * C_a \quad (4.4)$$

Sin embargo, en esta primera etapa se consideró que la degradación sería nula con el fin de observar el comportamiento del modelo.

Por su parte, las condiciones de borde fueron definidas como:

$$\nabla C_p = 0 \quad x = 0 \quad (4.5)$$

$$-N_p = N_a \quad x = e/2 \quad (4.6)$$

$$\nabla dC_a = 0 \quad x = d \quad (4.7)$$

Las Ecuaciones 4.5 y 4.7 describen las condiciones en los límites del modelo. Como se puede observar, ambas condiciones son iguales, sin embargo representan distintas situaciones. La primera representa la simetría del sistema en ese punto, debido a que  $x = 0$  corresponde a la mitad de la membrana y se espera que en ese punto exista una disminución de la concentración en forma simétrica debido a que el flujo de ampicilina debería ser igual por ambas caras de la membrana. En cambio, la Ecuación 4.7 representa un no-flujo en el punto que corresponde al límite sistema, en la interfase del medio acuoso con lo que en los experimentos corresponde al tubo Falcon, en donde la concentración de ampicilina debería ir aumentando a medida que se va acumulando en este dominio.

Debido a que no existen datos sobre lo que ocurre en la interfase entre el polímero y el medio acuoso ( $x = e/2$ ) es que sólo se consideró que el flujo de ampicilina que sale del polímero debe ser igual al flujo que ingresa al medio acuoso, como indica la Ecuación 4.6.

Las condiciones iniciales para esta primera iteración se definieron como:

$$C_p(x) = 337,08 \text{ [mol/m}^3] \quad x = [0, e/2] \quad (4.8)$$

$$C_a(x) = 0 \quad x = ]e/2, d] \quad (4.9)$$

Es decir, en esta etapa se considerará que la concentración de ampicilina al interior del polímero es homogénea, mientras que en el medio acuoso será inicialmente nula, debido a que no hay presencia del antibiótico antes de que la membrana toque el *buffer*.

Los resultados preliminares para PDL04 y las condiciones antes mencionadas se muestran en la Figura 4.12, en donde lo que se busca es determinar el rango e influencia de  $D_p$  como único parámetro desconocido hasta este punto:

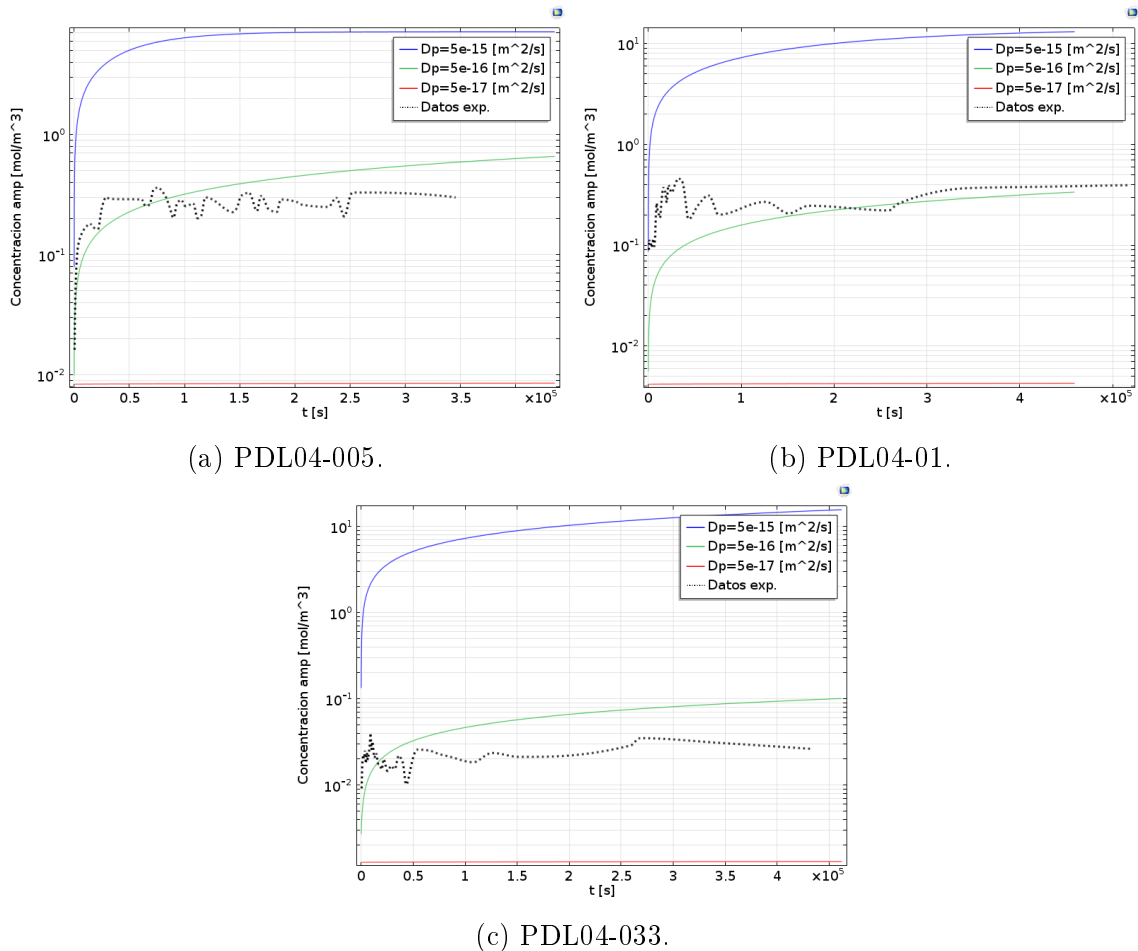


Figura 4.12: Simulaciones para la liberación de ampicilina en el medio acuoso para los tres espesores de membranas de PDL04 estudiados en este trabajo, para distintos valores de  $D_p$ .

A partir de estas simulaciones, lo primero que se observa es que en todos los casos sólo

existe acumulación del antibiótico en el medio acuoso debido a que no existe en este punto un término de consumo. Realizar este paso inicial ayuda a corroborar el buen funcionamiento del modelo debido a que es más sencillo verificar la conservación de masa de ampicilina.

Por otro lado, en las figuras se observa que las curvas de las membranas de mayor espesor alcanzan mayores niveles de concentración. Esto se puede deber a que la difusividad del antibiótico es muy baja en estos casos, por lo que el espesor de membrana no resulta ser una resistencia de la liberación del antibiótico, tomando importancia la cantidad de ampicilina que estas membranas albergan inicialmente.

A medida que disminuye la difusividad se observan resultados que asemejan más a lo observado en los resultados experimentales, como se ve en las tres figuras. Sin embargo, estas condiciones no resultan ser suficientes como para que se observe las diferencias de perfiles entre los tres espesores de membranas observadas en los datos experimentales.

Cabe mencionar que en este punto fue posible detectar errores numéricos relacionados con el mallado del modelo. En todas las simulaciones se puede ver que las curvas no parten de cero, lo cual se debe a que en  $t = 0$  existe una pendiente muy pronunciada en la interfase. Esto se puede solucionar en parte aumentando el número de puntos en esta zona y haciendo que el paso de integración inicial sea más pequeño. Además se disminuyó la tolerancia relativa del modelo. Todo lo anterior ayudó a que las concentraciones de las curvas en el estado inicial fueran más cercanas a cero.

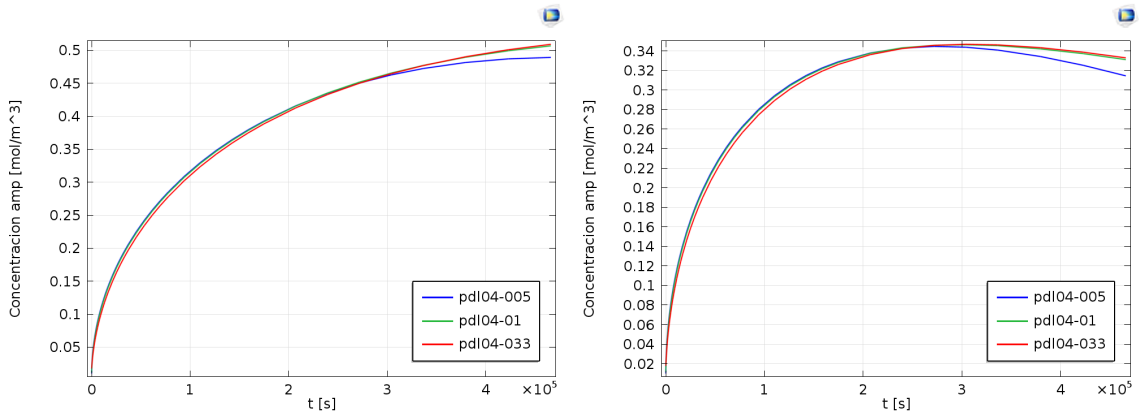
## Iteración 2

En este punto del estudio, se adiciona el efecto de la degradación de ampicilina por hidrólisis en el medio acuoso. Para esto se utilizó como referencia la velocidad de degradación calculada por F. Vera en su trabajo,  $k_{amp} = 4,4 \times 10^{-3} [1/h]$  [16].

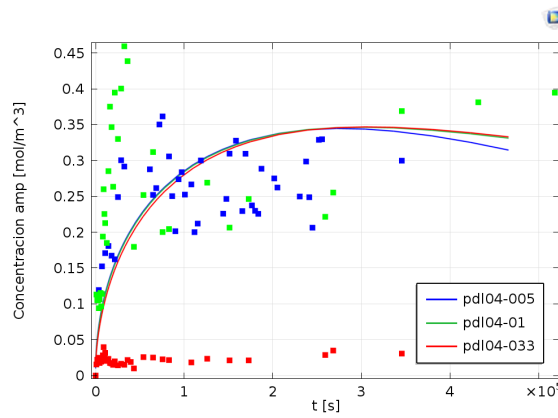
Debido al efecto del término de consumo se ve que la concentración de ampicilina ya no tiene una acumulación tan pronunciada (Figura 4.13a) o que comienza a decaer pasado el tiempo (Figura 4.13b). De aquí se puede concluir que la degradación de ampicilina es al menos 2,3 veces más rápida que la reportada por F. Vera [16], ya que, por lo que se ve en los datos experimentales, el efecto producido por la degradación es más fuerte (Figura 4.13c).

Sin embargo, en todos estos casos las simulaciones obtenidas no son capaces de explicar la diferencia de perfiles que presentan los 3 espesores de membrana. Por lo que se observa hasta este punto, el parámetro  $D_p$  hace que el espesor de membrana tome relevancia como factor controlador de la liberación, y por lo tanto debería generar la diferenciación de perfiles buscada.

Por otro lado, se observó que disminuir en exceso este parámetro producía que el flujo de ampicilina de la membrana al medio acuoso fuera lo suficientemente lento como para la concentración fuera disminuyendo con el tiempo.



(a)  $D_p = 6 \times 10^{-16} [m^2/s]$  y  $k_{amp} = 4,4 \times 10^{-3} [1/h]$ . (b)  $D_p = 6 \times 10^{-16} [m^2/s]$  y  $k_{amp} = 2,3 \times 10^{-3} [1/h]$ .



(c)  $D_p = 6 \times 10^{-16} [m^2/s]$  y  $k_{amp} = 2,3 \times 10^{-3} [1/h]$ , más datos experimentales.

Figura 4.13: Simulaciones para la liberación de ampicilina en el medio acuoso para los tres espesores de membranas de PDL04 estudiados en este trabajo, para distintos valores de  $D_p$  y  $k_{amp}$ .

### Iteración 3

De este modo, se decidió realizar una doble modificación al modelo: se disminuyó el  $D_p$  con tal obtener los perfiles deseados en base a los datos de la membrana de mayor espesor, y se agregó la no-homogeneidad de la condición inicial para las membranas de menor espesor según lo que dice la Ecuación 4.10.

$$C_p(x) = \begin{cases} 0 & \text{si } x \in [0, e_i[ \\ 2500 & \text{si } x \in [e_i, e/2] \end{cases} \quad (4.10)$$

En dónde la Ecuación 4.10 representa la concentración al interior de la membrana, teniendo en consideración la hipótesis de que durante la fabricación de las membranas, una cantidad mayor de ampicilina queda acumulada en la superficie del dispositivo, lo que generaría la liberación explosiva, como se explicó en la Sección 2.3. Debido a que no se conoce la

distribución de concentración en el interior de la membrana es que se decidió representarla como un escalón que represente una concentración alta en la superficie de la membrana y cero en el interior, en donde en punto  $e_1$  dependerá de cada membrana como se describe en Anexos D. El motivo de este supuesto es que después de algunas simulaciones se determinó que una alta concentración en la superficie de la membrana genera efectos similares a los observados en los datos experimentales. Además de la necesidad de conservar la masa inicial de ampicilina en este supuesto, un escalón era una función sencilla que permitía estudiar el efecto de este supuesto en la simulación.

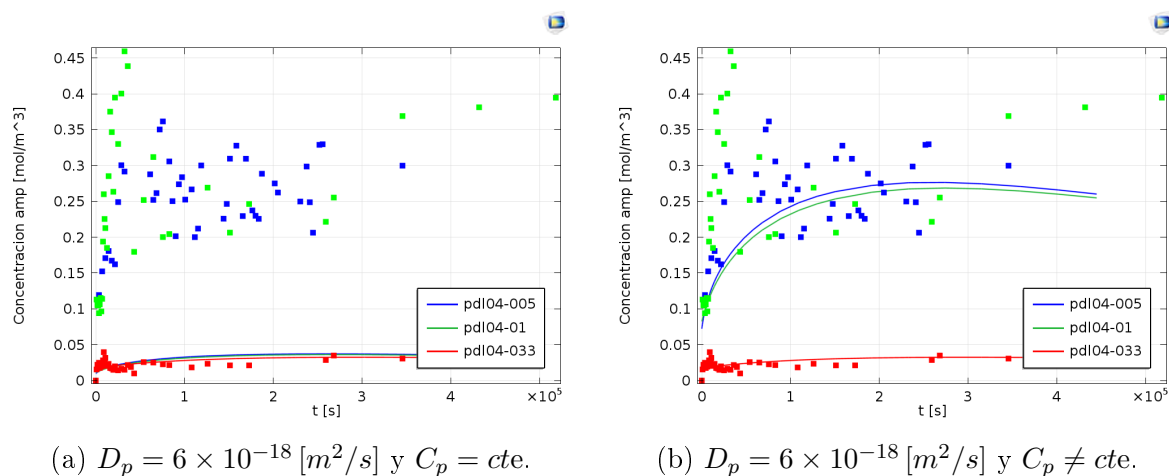


Figura 4.14: Simulaciones para la liberación de ampicilina en el medio acuoso para los tres espesores de membranas de PDL04 estudiados en este trabajo, para distintas condiciones iniciales.

Como resultados generales de este supuesto se obtuvo lo que se muestra en la Figura 4.14. En la figura de la izquierda se observa la simulación para una difusividad muy baja y una concentración inicial homogénea al interior de la membrana. Como se ve, los resultados obtenidos para los 3 espesores de membranas son bastante parecidos, pero aún así se diferencian una de otra, obteniéndose que la membrana más delgada alcanzó concentraciones mayores que la de mayor espesor, como se espera según lo visto en los datos experimentales.

No obstante, los niveles de concentración que alcanzan las membranas más delgadas no corresponden a lo que se observó experimentalmente. Esta situación puede ser debido al efecto del *burst release*, el cual se decidió expresar como una acumulación del antibiótico en las proximidades de la superficie de la membrana, como se expresó en la Ecuación 4.10. Los resultados de la adición de esta condición se observan en la Figura 4.14b.

Cabe mencionar que como resultado final de esta iteración, sólo se agregó la condición inicial no-homogénea a las membranas de espesor 0,005 y 0,01 [cm], mientras que la membrana de 0,033 [cm] conservó la condición inicial homogénea. Esto se hizo con el fin de obtener un mejor ajuste a las curvas experimentales. Una explicación a estas diferencias en la condición inicial para estas membranas es que las membranas de menor espesor tienen una mayor relación superficie/volumen por lo que pueden ser más propensas a almacenar ampicilina en su superficie que en el volumen interior de ellas.

## Iteración 4

Finalmente, se adicionan al modelo las ecuaciones que definen la variación de la difusión de la ampicilina en el polímero a medida de que el PLA se va degradando. Se tomaron dos alternativas, Ecuación 2.12 y Ecuación 2.13, que fueron propuestas en literatura y que fueron descritas en la sección 2.4. En todos estos casos se consideró que la velocidad de degradación del polímero es igual a  $k = 0,104 \text{ [d}^{-1}]$  [46, 47].

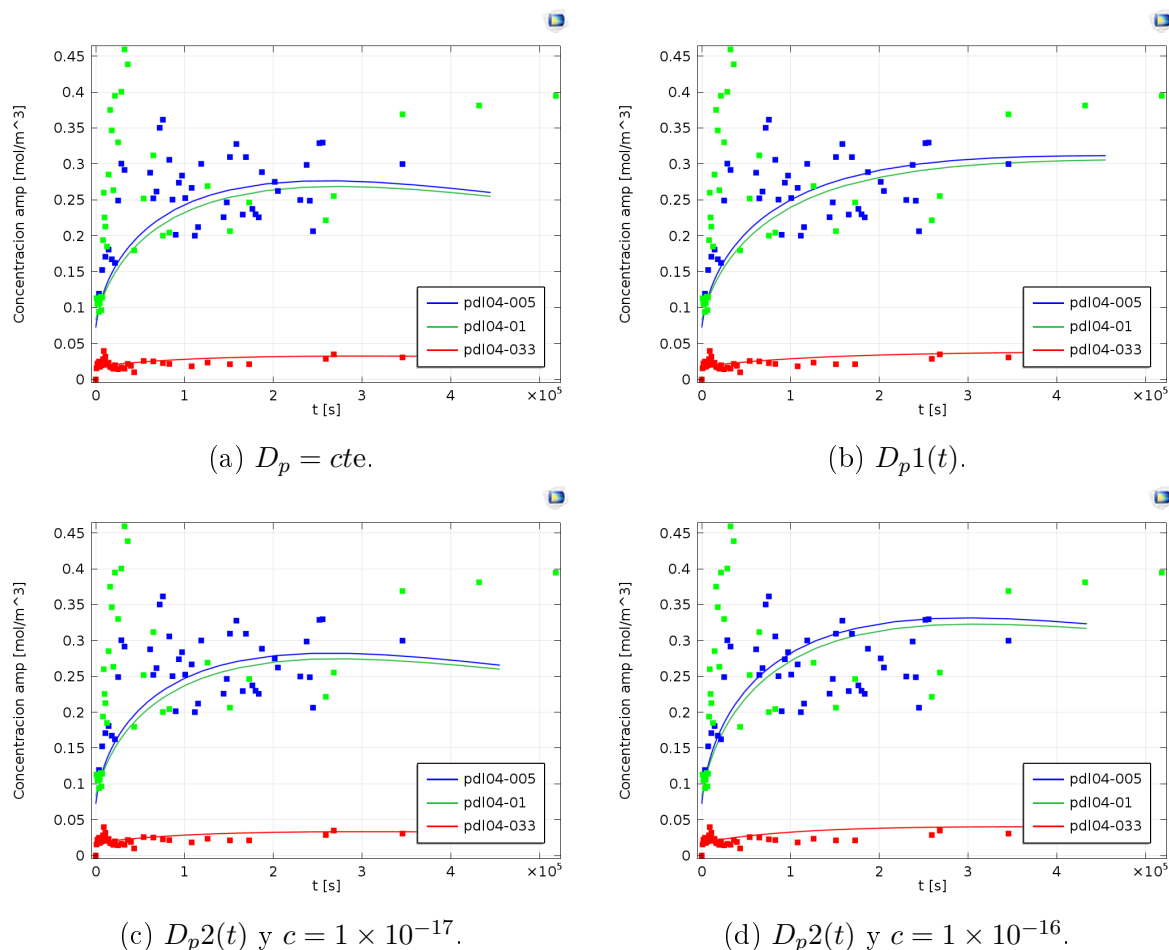


Figura 4.15: Simulaciones para la liberación de ampicilina en el medio acuoso para los tres espesores de membranas de PDL04 estudiados en este trabajo, para distintas funciones del coeficiente de difusión de ampicilina en el polímero.

Como es de esperar y como se observa en las distintas simulaciones que se muestran en la Figura 4.15, la incorporación de este fenómeno en el modelo tiene efectos en etapas posteriores de la liberación, facilitando la difusión del antibiótico a medida que pasa el tiempo. De este modo, se puede ver que puede lograr que vaya aumentando la concentración de ampicilina en etapas finales de la simulación (Figuras 4.15b y 4.15d), a diferencia de lo que se obtiene si el coeficiente difusivo es considerado constante, como se ve en la Figura 4.15a. La Figura 4.15c indica que para la Ecuación 2.13 el coeficiente  $c$  puede lograr que el efecto de degradación sea casi imperceptible si es muy pequeño, pero puede generar efectos similares a lo propuestos por la Ecuación 2.12, como se ve al comparar las Figuras 4.15b y 4.15d.



Sin embargo, debido al tiempo en que fueron tomados los datos experimentales, no es posible concluir mayormente sobre el efecto o la valides de adicionar este efecto en el modelo. Para esto sería necesario aumentar el tiempo de experimentación con el fin de poder definir el modelo que pueda simular correctamente etapas más tardías de la liberación del antibiótico.

## Iteración 5

En esta parte se analizan los datos experimentales para PDL02 a partir de los resultados obtenidos anteriormente. Se decide tratar ambos set de datos por separado debido a que la síntesis de membranas con ambos polímero fue distinta, condiciones que hacen que los datos obtenidos para ambos casos no sean comparables.

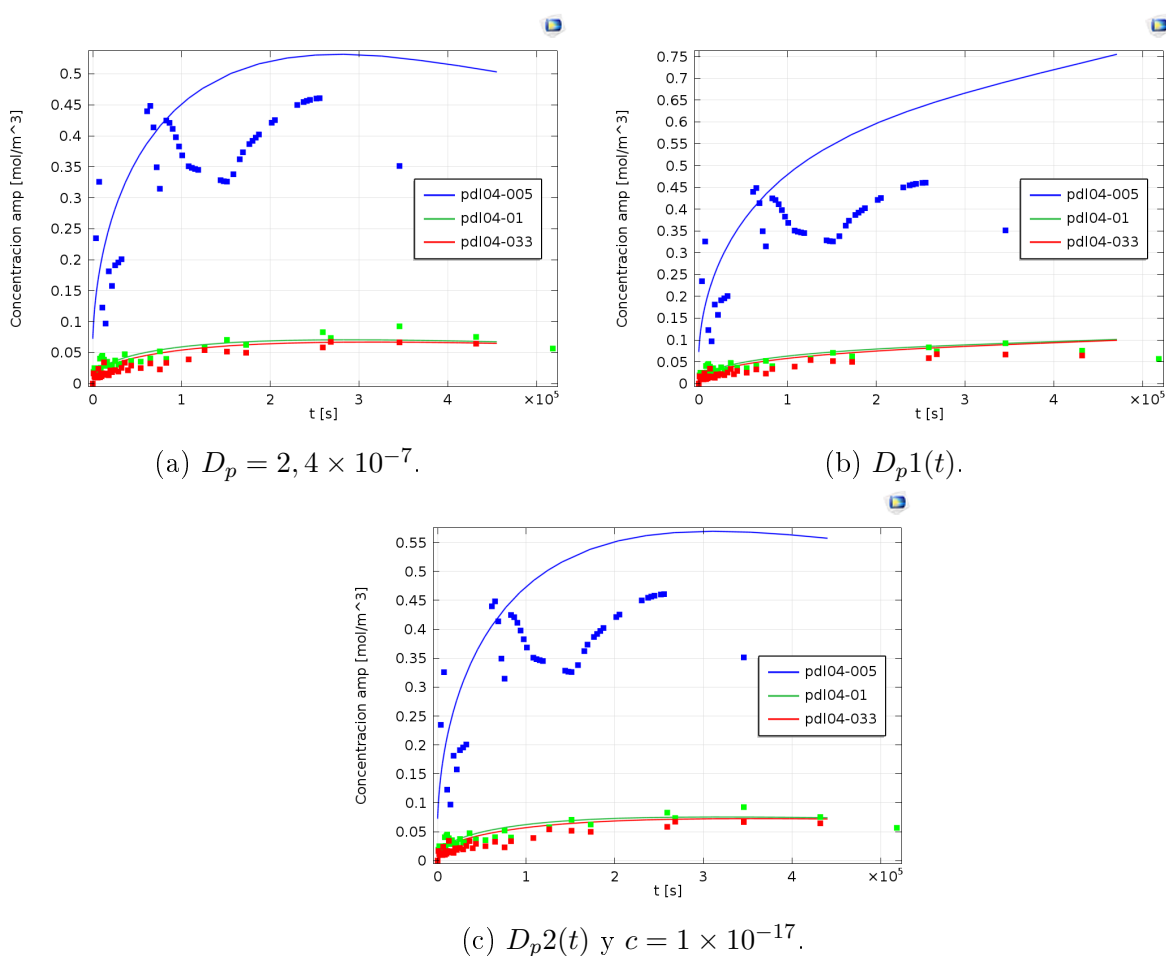


Figura 4.16: Simulaciones para la liberación de ampicilina en el medio acuoso para los tres espesores de membranas de PDL02 estudiados en este trabajo, para distintas funciones del coeficiente de difusión de ampicilina en el polímero.

Para el caso de PDL02, la concentración no-homogénea sólo se aplicó para la membrana de 0,005 [cm] debido a que era la única que presentó un aumento tan abrupto en los datos experimentales. Al igual que para PDL04, la explicación podría tener relación con la razón

superficie/volumen de las membranas. Sin embargo, la adición de  $CaCO_3$  podría haber tenido influencia en el espesor de estas membranas, generando membranas de una densidad y grosor distinto al esperado. De este modo, se supone que en realidad se fabricaron membranas de un espesor mayor al calculado, lo que podría explicar por que la membrana de 0,01 [cm] no requiere de una concentración inicial no-homogénea en este caso.

Por otro lado, se obtuvo que el coeficiente de difusión de ampicilina en este polímero es al menos un grado de magnitud menor que en PDL04. Éste era un resultado esperado debido a que las cadenas más cortas de PDL02 formarían una red polimérica menos densa, y que se degrada más rápido [47].

Con respecto a las funciones de difusividad de ampicilina en el polímero, se observa que en este caso la Ecuación 2.12 no representa correctamente lo que ocurre en los datos experimentales, teniendo mejores resultados la Ecuación 2.13. Esta diferencia se puede deber también a la presencia de  $CaCO_3$  que puede impedir la liberación ampicilina, no dejando ver el efecto de la degradación del polímero sobre esta difusividad.

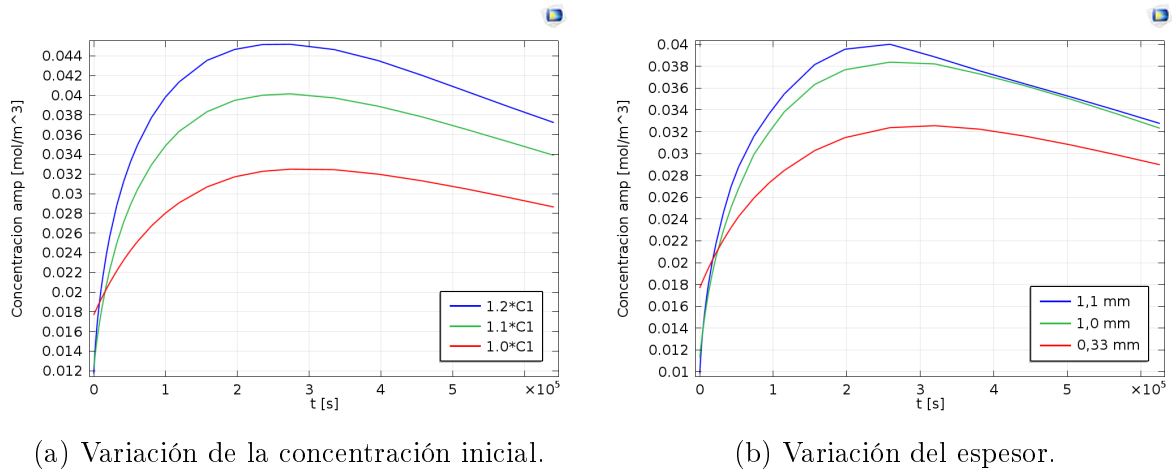
### 4.2.3. Diseño del dispositivo

A partir de los parámetros del modelo definidos en la etapa anterior, se busca encontrar el diseño óptimo de la membrana de PLA cargada con ampicilina para poder usada para el tratamiento de enfermedades infecciosas, como la OMA.

Como consideraciones previas está el determinar cuál es la concentración de ampicilina deseada para el tratamiento de esta enfermedad, además de que se la concentración del antibiótico se mantenga constante durante el período de tratamiento. Para ello se considero la Concentración Mínima de Inhibición de los 3 microorganismos presentes en la OMA. Según la base de datos de The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Streptococcus pneumoniae* tienen un MIC de ampicilina de 1; 0,125 y 0,064 mg/L, respectivamente [54]. Por otro lado, en el estudio realizado por Goycoolea [31] se determina que el dispositivo PLA-TEC-ampicilina, que liberó 3,8  $\mu$ g de ampicilina en 5 mL (igual a 0,0076 mg/mL) de *buffer* en un ensayo *in vitro*, fue capaz de tratar la infección en un ensayo *in vivo*. Es decir, bajo estos datos una concentración de 0,001 mg/mL ó 0,04 mol/m<sup>3</sup> de ampicilina sería necesaria para el tratamiento de la OMA.

Observando el comportamiento de los datos experimentales, se determina que la configuración que tiene un comportamiento que más se parece a los buscado es PDL04-033, ya que mantiene de forma más constante concentraciones cercanas. Además, presenta una aparente concentración inicial homogénea, la cual es una característica deseable en un dispositivo médico y facilita la simulación y condiciones del modelo. Se descarta el uso de PDL02 debido a que se observa que las concentraciones de ampicilina en el medio liberadas por estos dispositivos va aumentando en estados finales de la experimentación, lo que indica que posiblemente siga en aumento ya que, como se discutió anteriormente, no han agotado la carga de ampicilina en las membranas.

De este modo, el siguiente paso consistió en estudiar la influencia de la variación de la concentración inicial y y del espesor de membrana cercanos a características de PDL04-033. Estos resultados se muestran en la Figura 4.17.



(a) Variación de la concentración inicial.

(b) Variación del espesor.

Figura 4.17: Simulaciones para la liberación de ampicilina en el medio acuoso desde membranas de PDL04.

En la Figura 4.17a se observa el aumento del aumento de la concentración en un 10% y 20% con respecto a la concentración usada en la fase experimental. Como es de esperar, un aumento en la concentración inicial en la membrana logra que se alcance una mayor concentración del antibiótico en el medio acuoso. Sin embargo, se debe tener cuidado con aumentar demasiado la concentración inicial de ampicilina, ya que se podría incitar el fenómeno de *burst release* al concentrarse mucho de este soluto en la superficie de la membrana.

Por otro lado, en la Figura 4.17b se estudia la influencia del espesor de membrana. En este caso se tiene que un aumento del espesor de membrana produce que aumente la concentración en el medio acuoso. A pesar de que esto contradice lo analizado anteriormente, esto puede tener dos posibles explicaciones. La primera de ellas puede ser el error numérico, presente en todas las simulaciones, que hace que la concentración en el medio acuoso fuera distinta de cero en el tiempo cero y que no se logró disminuir más sin comprometer el tiempo de simulación del modelo. La segunda explicación es que debido a que la variación de espesor de membrana es muy pequeña, se torna importante la cantidad de ampicilina que estas albergan durante la simulación, más que la resistencia que podría generar el grosor de éstas.

Una salvedad que se debe hacer con la modificación de este parámetro es que disminuirlo podría dificultar el proceso de fabricación de membranas, mientras que su aumento excesivo podría ocasionar que el dispositivo no fuera apto para ser introducido en cavidades tan pequeñas, como lo es el oído medio.

A partir del análisis anterior, se determinó que la configuración óptima de membrana es la que se muestra en la Figura 4.18, en donde la membrana de espesor de 1 mm y concentración inicial 0,1653 gr/cm<sup>3</sup> de ampicilina en la membrana muestra tener un comportamiento deseado durante el tiempo de simulación que corresponde a los 7 días necesarios para el

tratamiento de enfermedades infecciosas.

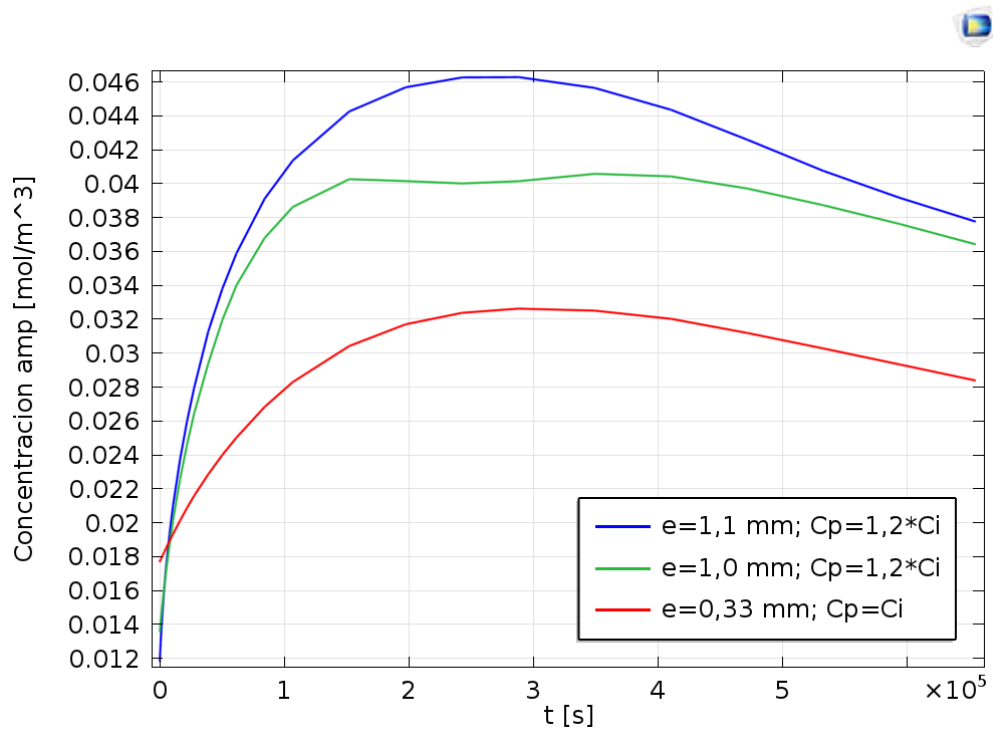


Figura 4.18: Simulación del diseño resultante del dispositivo.

En esta imagen es posible observar una oscilación en la curva perteneciente a la membrana de espesor 1 [mm], la cual tiene explicación en un error numérico de la simulación.

# Conclusiones

A partir de una lista de fenómenos que ocurren en dispositivos similares a las membranas de PLA cargadas con ampicilina estudiadas en este trabajo, se logró identificar una serie de fenómenos que resultan relevante en el fenómeno de liberación del antibiótico. Esto se logró a partir de datos experimentales obtenidos en un trabajo previo para este sistema y a partir de información bibliográfica tanto del polímero como del antibiótico. De esta forma, los fenómenos considerados fueron: Difusión del antibiótico en el polímero, degradación de la ampicilina en el medio acuoso, degradación del polímero y la liberación explosiva.

Se desarrolló un modelo en una dimensión en base a estos fenómenos. Para esto fue necesario la determinación de las ecuaciones matemáticas que describen cada fenómeno para su posterior implementación en una plataforma. En este trabajo se utilizó el *software* COMSOL Multiphysics que permite construir modelos basados en la físico-química, facilitando la generación de la geometría y mallado del sistema. Sin embargo, esta característica también trajo algunas complicaciones debido a que era más difícil encontrar el origen y posible solución de los errores numéricos.

Por otro lado, a pesar de que la herramienta computacional utilizada para implementar el modelo permite generar fácilmente geometrías 3D y 2D, se decidió utilizar un modelo 1D debido a que de este modo no sólo se disminuye la complejidad de la implementación, sino que también se consideró que es suficiente para la obtención de los parámetros de diseño, dada las condiciones de los experimentos *in vitro*.

Para una posterior simulación de la liberación de ampicilina de un modelo 2D o 3D, sería necesario considerar los errores numéricos debido a la diferencia de las concentraciones iniciales en ambos dominios. Como se vio en este trabajo, la forma de reducir estos errores es aumentando la cantidad de puntos en la cercanías de la interfase, así como el paso de integraciones en estados iniciales de la simulación. Sin embargo, esta acción tendría grandes repercusiones en los tiempo que tomaría la generación del mallado y posterior simulación del modelo ya que se aumentaría la cantidad de puntos en todas la superficie del dispositivo.

Como resultado de la etapa experimental, se logró realizar estudios experimentales de la liberación de ampicilina desde membranas de PLA *in vitro*. Para esto se diseñaron experimentos que proporcionaran datos que posteriormente pudieran ser utilizados para ajustar el modelo. Teniendo en consideración su uso y los datos de liberación que ya se tenían de este sistema, es que se consideró la fabricación de membranas de PLA cargadas con

un 10 % $p/p$  de ampicilina y de tres espesores distintos (0,005; 0,01 y 0,033 [mm]). Además, se utilizaron dos PLA's de peso moleculares distintos para estudiar la influencia de este parámetro.

Cabe mencionar que para la fabricación de membranas de PDL02 fue necesario desarrollar un nuevo protocolo de síntesis de membrana debido a las características intrínsecas del polímero, como lo son su fragilidad y capacidad para retener solvente. Este hecho produjo que los experimentos con ambos polímeros (PDL02 y PDL04) no fueran comparables directamente, ya que la diferencia en el peso molecular promedio (Mw) ya no fue el único factor que diferencia las membranas fabricadas con ambos PLA.

Las experiencias de liberación la gran cantidad de duplicados y triplicados se considera necesaria debido a que a pesar de que se obtuvieron membranas que visualmente parecían tener una distribución homogénea de ampicilina, lo que no se condice con lo observado en los datos experimentales. La homogeneidad del dispositivo es uno de los problemas que se debe abordar en futuros estudios con el fin de obtener un producto de características menos variables, ya que como sistema de administración de fármaco debe cumplir con altos estándares de calidad.

Por otro lado, no fue posible obtener resultados sobre la degradación de ampicilina en presencia de bacterias debido a que el medio de cultivo utilizados tiene componentes que son leídos por el equipo de RT-HPLC en la misma frecuencia de espectro UV y tiempo de elusión que la ampicilina. Para solucionar esto, se siguiere con intentar utilizar un medio mínimo de cultivo con el fin de disminuir la presencia de estos componentes que impiden la medición de la cantidad del antibiótico.

Así, se obtuvieron 5 perfiles de liberación, los cuales fueron complementados por un set de datos obtenido en un trabajo previo.

Se logró obtener parámetros que permiten que el modelo describa los observado en los datos experimentales. Se obtuvo que el coeficiente de difusión era mayor en PDL02 que en PDL04, lo cual concuerda con lo esperado debido a la diferencia en la red polimérica que deben formar los distintos largos de cadena. Además, una concentración no-homogénea es la explicación para algunos de los perfiles obtenidos en los datos experimentales, lo cual concuerda con lo estudiado en literatura.

Un coeficiente difusivo que vaya aumentando con el tiempo es la explicación para el aumento o constancia de la concentración en etapas finales de la liberación estudiada. Sin embargo, no fue posible concluir al respecto debido a que los datos experimentales no proporcionaban datos de liberación prolongada. Debido a esto, es que una sugerencia para trabajos futuros es realizar experimentos de liberación prolongada *in vitro*.

La concentración de ampicilina necesaria para el tratamiento de la OMA depende del grado de infección de esta enfermedad, por lo que el valor calculado como referencia en este trabajo podría estar sujeto a modificaciones. Así, se debería considerar este factor parte importante del diseño de este tipo de dispositivos.

Finalmente, se determinó que de los polímeros estudiados, PDL04 era el más indicado para la síntesis de dispositivos para el tratamiento de enfermedades infecciosas debido a que genera perfiles de liberación constantes. Por otro lado, a partir del modelo se determinó que una membrana de espesor 1 [mm] y una concentración inicial de  $0,1653 \text{ gr/cm}^3$  permitirían obtener un perfil constante y de una concentración deseada para el tratamiento de la OMA, lo cual queda por comprobar empíricamente en futuras versiones de este proyecto.

# Bibliografía

- [1] RUBIOL CAMPS, T., VALVERDE GÓMEZ, F., FERNÁNDEZ MÉNDEZ, M., JIMÉNEZ SAN EMETERIO, J. Tratamiento de la otitis media aguda en la infancia . Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud, 23(6): 160–4, 1999.
- [2] RAGHANAVEEN. Biodegradable Polymers in Controlled Drug Delivery. abril 2009.
- [3] MedlinePlus Información de salud para usted. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/medlineplus.html>. Accessed: 2014-08-21.
- [4] CONNORS, K., AMIDON, G., STELLA, V. Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists. 2da ed<sup>ón</sup>. John Wiley & Sons, Inc., 1986, 198–207 págs.
- [5] HOU, J., POOLE, J. Kinetics and mechanism of degradation of Ampicillin in solution. Journal of Pharmaceuticals Sciences, 58: 447–454, 1968.
- [6] GARLOTTA, D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). Journal of Polymers and Enviorement, 9(2): 63–84, 2002.
- [7] LASPRILLA, A.J.R., MARTINEZ, G.A.R., LUNELLI, B.H., JARDINI, A.L., FILHO, R.M. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - a review. Biotechnology advances, 30(1): 321–8, 2012.
- [8] AURAS, R., SELKE, S., LIM, L., TSUJI, H. Poly(lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and application. 2010.
- [9] HAN, X. Degradation models for polyesters and their composites. Tesis de Doctorado, University of Leicester, 2011.
- [10] BARAÚNA, G., CORAÇA-HUBER, D.C., DUEK, E.A.D.R. In vitro degradation of Poly-L-co-D, L-lactic acid membranes. Materials Research, 16(1): 221–226, feb. 2013.
- [11] HUANG, X., BRAZEL, C.S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. Journal of controlled release, 73(2-3): 121–36, jun. 2001.



- [12] LAO, L.L., PEPPAS, N.A., BOEY, F.Y.C., VENKATRAMAN, S.S. Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. International journal of pharmaceutics, 418(1): 28–41, oct. 2011.
- [13] HIGUCHI, T. Mechanism of Sustained-Action Medication. Journal of pharmaceutical sciences, 52(12): 1145–49, 1963.
- [14] LEMAIRE, V. Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. International Journal of Pharmaceutics, 258(1-2): 95–107, jun. 2003.
- [15] ZYGOURAKIS, K. Development and temporal evolution of erosion fronts in bioerodible controlled release devices. Chemical Engineering Science, 454: 2359–66., 1990.
- [16] VERA JEREZ, F.A. Identificación y modelación de la fenomenología involucrada en el mecanismo de liberación de ampicilina desde una membrana biodegradable, 2010.
- [17] LANGER, R., PEPPAS, N., SCIENCE, F., LAFAYETTE, W. Chemical and Physical Structure of Polymers as Carriers for Controlled Release of Bioactive Agents: A Review. Journal of Macromolecular Science, C23(1): 61–126, 1983.
- [18] PILLAI, O., DHANIKULA, A.B., PANCHAGNULA, R. Drug delivery: an odyssey of 100 years. Current Opinion in Chemical Biology, 5: 439–46, 2001.
- [19] UHRICH, K.E., CANNIZZARO, S.M., LANGER, R.S., SHAKESHEFF, K.M. Polymeric systems for controlled drug release. Chemical reviews, 99(11): 3181–98, nov. 1999.
- [20] WALTER, K.A., BURGER, P.C., OLIVI, A., TAMARGO, R.J., HENRY, B. Intratumoral Chemotherapy. Neurosurgery, 37: 1129–45, 1994.
- [21] DANG, W., COLVIN, O.M., BREM, H., SALTZMAN, W.M. Covalent coupling of methotrexate to Dextran enhances the penetration of cytotoxicity into a tissue-like matrix. Cancer Research, 54: 1729–1735, 1994.
- [22] KATAYAMA, N., TANAKA, R., OHNO, Y., UEDA, C., HOUJOU, T., TAKADA, K. Implantable slow release cyclosporin A (CYA) delivery system to thoracic lymph duct. International Journal of Pharmaceutics, 115: 87–93, 1995.
- [23] WAGENAAR, B., MÜLLER, B. Piroxicam release from spray-dried biodegradable microspheres. Biomaterials, 15: 49–54, 1994.
- [24] CONFORTI, A., BERTANI, S., LUSSIGNOLI, S., GRIGOLINI, L., TERZI, M., LORA, S., CALICETI, P., MARSILIO, F., VERONESE, F.M. Anti-inflammatory activity of polyphosphazene-based naproxen slow-release systems. Journal of pharmacy and pharmacology, 48: 468–473, 1996.

- [25] KALALA, W., KINGET, R., VAN DEN MOOTERA, G., SAMYN, C. Colonic drug-targeting: In vitro release of ibuprofen from capsules coated with poly(ether-ester) azopolymers. International Journal of Pharmaceutics, 139: 187–95, 1996.
- [26] MCGEE, J., DAVIS, S., O'HAGAN, D. The immunogenicity of a model protein entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microparticles prepared by a novel phase separation technique. Journal of Controlled Release, 31: 55–60, 1994.
- [27] WEI-PING YE, CHIEN, Y.W. Dual-controlled drug delivery across biodegradable copolymer. II. Delivery kinetics of levonorgestrel and estradiol from (matrix/matrix) laminate drug delivery system. Journal of Controlled Release, 41: 259–69, 1996.
- [28] JOHNSON, O.L., CLELAND, J.L., LEE, H.J., CHARNIS, M., DUENAS, E., JAWOROWICZ, W., SHEPARD, D., SHAHZAMANI, A., JONES, A.J., PUTNEY, S.D. A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone. Nature medicine, 2: 795–9, 1996.
- [29] MANIAR, M., DOMB, A., HAFFERA, A., SHAH, J. Controlled release of a local anesthetic from fatty acid dimer based polyanhydride. Journal of Controlled Release, 30: 233–9, 1994.
- [30] SCHIERHOLZ, J.M., STEINHAUSER, H., RUMP, A., BERKELS, R., PULVERER, G. Controlled release of antibiotics from biomedical polyurethanes: morphological and structural features. Biomaterials, 47: 839–44, 1997.
- [31] GOYCOOLEA, M.V., MUCHOW, D.C., SIRVIO, L.M., WINANDY, R.M. In search of missing links in otology. II. Development of an implantable middle ear drug delivery system: Initial studies of sustained ampicillin release for the treatment of otitis media. Laryngoscope, 101: 727–732, 1991.
- [32] MUCHOW, D.C., SIRVIO, L.M. Device and method for extended delivery of pharmacologically active agents to the ear, 1994.
- [33] HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drug in suspension. Journal of pharmaceutical sciences, 50(10): 874–75, 1961.
- [34] DIAZ PEREZ, D. BT69A Informe de Práctica Profesional III. Inf. téc., Universidad de Chile, Santiago, 2010.
- [35] SANTOLAYA DE P., M.E. Otitis media aguda. Diagnóstico y tratamiento. Revista Chilena de Infectología, 24(4): 297–300, 2007.
- [36] SHOEMAKER, W.C. Tratado de medicina crítica y terapia intensiva. 4ta edición ed<sup>ón</sup>. Editorial Médica Panamericana.
- [37] HOU, J., POOLE, J. The amino acid nature of ampicillin and related penicillins. . Journal of Pharmaceutics Sciences, 58: 1510–15, 1969.

- [38] TSUJI, A., NAKASHIMA, E., HAMANO, S., YAMANA, T. Physicochemical properties of amphoteric B-lactam antibiotics I: Stability, solubility and dissolution behavior of amino penicillins as a function of pH. Journal of Pharmaceuticals Sciences, 67: 1059–66, 1977.
- [39] HARTMANN, M.H. Biopolymers from Renewable Resources . Springer-Verlag, 1998, 367–411 págs.
- [40] KULKARNI, R.K., PANI, K.C., NEUMAN, C., LEONARD, F. Polylactic Acid for Surgical Implants. Archives of International Surgery, 93: 839–43, 1966.
- [41] AURAS, R., HARTE, B., SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. Macromolecular Bioscience, 4: 835–64, 2004.
- [42] GUPTA, B., REVAGADE, N., HILBORN, J. Poly(lactic acid) fiber: an overview. Progress in Polymer Science, 34: 455–82, 2007.
- [43] YAMANE, H., SASAI, K. Effect of the addition of poly( D -lactic acid) on the thermal property of poly( L -lactic acid). Polymer, 44: 2569–75, 2003.
- [44] GRIFFITH, L. Polymeric biomaterials , tomo 48. Elsevier, 2000, 263–77 págs.
- [45] ATALA, A., MOONEY, D. Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds. Birkhäuser Boston, 1997.
- [46] PITT, C.G., GRATZL, M.M., KIMMEL, G.L., SURLS, J., SCHINDLER, A. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo. Biomaterials, 2(4): 215–20, oct. 1981.
- [47] WADA, R., HYON, S.H., IKADA, Y. Kinetics of diffusion-mediated drug release enhanced by matrix degradation. Journal of Controlled Release, 37: 151–160, 1995.
- [48] SIEPMANN, J., GÖPFERICH, A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. Advanced drug delivery reviews, 48(2-3): 229–47, jun. 2001.
- [49] LIVSHITS, V.S., ZAIKOV, G.E. Biodegradable Polymer-Based Controlled Release Systems: The Physicochemical Aspects. Part I. Systems and Mechanisms. International Journal of Polymeric Materials, 16(1-4): 267–276, feb. 1992.
- [50] ROMERO-CANO, M.S., VINCENT, B. Controlled release of 4-nitroanisole from poly(lactic acid) nanoparticles. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 82(1): 127–35, jul. 2002.
- [51] SEADER, J.D., HENLEY, E.J., ROPER, D.K. Separation Process Principles. Chemical and Biochemical Operations. Third edition ed<sup>6th</sup>. John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- [52] GOEPFERICH, A., LANGER, R. Modeling of Polymer Erosion. Macromolecules, 26:

4105–4112, 1993.

- [53] (ESCMID), E. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Inf. Téc.* 8, 2004.
- [54] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST 2014. [http://www.eucast.org/mic\\_distributions/](http://www.eucast.org/mic_distributions/), 2014.
- [55] COMPETITION (iGEM), E.I.G.E.M. PyeaR + CArG nitric oxide, nitrate & nitrite-sensing hybrid 'Bacterial-Mammalian' promoter. 2012.
- [56] BIOLINE. Alpha-Select Gold Efficiency. 2014.
- [57] KASUGA, T., MAEDA, H., KATO, K., NOGAMI, M., HATA, K.I., UEDA, M. Preparation of poly(lactic acid) composites containing calcium carbonate (vaterite). *Biomaterials*, 24: 3247–53, 2003.
- [58] LEEA, J.B., CHUNGB, H.H., CHUNGB, Y.H., LEE, K.G. Development of an analytical protocol for detecting antibiotic residues in various foods. *Food Chemistry*, 105(4): 1726–31, 2007.
- [59] WASIK, S., ARABSKI, M., DRULIS-KAWA, Z., GUBERNATOR, J. Laser interferometry analysis of ciprofloxacin and ampicillin diffusion from liposomal solutions to water phase. *European biophysics journal*, 42(7): 549–58, jul. 2013.
- [60] YEWA, G., MOHD YUSOFA, A., MOHD ISHAKA, Z., ISHIAKUB, U. Water absorption and enzymatic degradation of poly(lactic acid)/rice starch composites. *Polymer Degradation and Stability*, 90(3): 488–500, 2005.

# Anexos

# Anexo A

## Protocolos Experimentales

### A.1. Evaluación de la degradación de la ampicilina en solución en presencia de bacterias

#### Materiales

- Cultivo de cepa de *E. coli DH5 $\alpha$*
- 40 *mL* de medio LB
- *Shaker* a 37°C y 250 RPM
- Espectrofotómetro
- Cubetas para espectrofotómetro.
- Congelador a -70°C
- *Buffer* fosfato 0,01 M pH 7
- Ampicilina trihidratada
- Micropipeta 5000  $\mu L$
- Micropipeta 1000  $\mu L$
- Micropipeta 200  $\mu L$
- Tubos *ependorf* de 1,5 *mL*
- Tubos Falcon de 15 *mL*
- Tubos Falcon de 50 *mL*

#### Procedimiento

1. Preparar un inóculo de *E. coli* de 5 *mL* en medio LB en un tubo Falcon de 15 *mL* durante la tarde.
2. Al día siguiente, medir la absorbancia del inóculo diluido a la mitad.
3. Determinar la concentración del inóculo y calcular el volumen necesario para obtener una concentración final de  $5 * 10^5 CFU/mL$  en 16 *mL*.

4. En un tubo Falcon de 50mL adicionar 14 mL de medio LB. Añadir el volumen del inóculo calculado anteriormente.
5. Preparar 5 mL de una solución de ampicilina en *buffer* fosfato de 64 mg/L en un tubo Falcon de 15 mL.
6. Adicionar 2 mL de la solución de ampicilina al tubo Falcon con los 16 mL de medio LB y el inóculo.
7. Dejar el tubo Falcon en el *sheaker*.
8. Ir tomando una muestra de 1 mL de cultivo cada 1 hora y dejarlo en un tubo *eppendorf* en el congelador.

## A.2. Preparación de *buffer* fosfato 0,01 M pH 7

### Materiales

- Matraz de 1 litro
- 8 gr de  $NaCl$
- 0,2 gr de  $KCl$
- 1,44 gr de  $Na_2HPO_4$
- 0,24 gr de  $KH_2PO_4$
- 1 litro de agua desionizada Mili
- Balanza digital
- Agitador magnético
- Bala magnética
- pH-metro

### Procedimiento

1. Pesar cada una de las sales por separado en una balanza digital.
2. Poner en el matraz cada una de las sales pesadas y una bala magnética.
3. Verter 1 litro de agua desionizada en el matraz y disolver las sales usando el agitador magnético.
4. Ajustar el pH a 7 mientras se continúa agitando.
5. Después de esto, la solución está lista para ser usada y se guarda en un frasco de tapa azul. Rotular con la fecha de preparación.
6. Mantener refrigerado si no se va a usar.

## A.3. Uso y almacenamiento de PLA

### Almacenamiento

- El PLA debe ser almacenado en un envase sellado.
- Se debe almacenar refrigerado.

Antes de usar

- Se debe dejar que el PLA alcance la temperatura ambiente antes de abrir el envase.
- Se recomienda secar a 40°C durante 4 horas bajo vacío para extraer humedad.

## A.4. Síntesis de las membranas de PLA (PDL04) cargadas con ampicilina

Materiales

- Ácido poli-láctico *Purasorb* PDL 04
- Diclorometano
- Ampicilina trihidratada
- Vaso precipitado de 50 *mL*
- Agitador magnético y bala magnética
- *Parafilm*
- Balanza digital
- Bisturí
- Placa de Petri de vidrio de 14,7 *cm* de diámetro
- Teflón
- Cinta doble faz

Procedimiento

\*\* El procedimiento debe realizarse bajo campana.

1. Se prepara una placa de Petri que tenga un fondo de teflón. Para eso se corta una un trozo de teflón que tenga la forma del fondo de la placa y se pega con cinta doble faz.
2. Se pesan  $X$  *g* de ácido poli-láctico y se dejan en el vaso precipitado. Los gramos de polímero van a determinar el espesor de la membrana. En la Tabla A.1 las cantidades usadas.
3. Se miden aproximadamente 30 *mL* de diclorometano y se vierten en el mismo vaso precipitado.
4. Se sumerge una bala magnética en el vaso precipitado y se tapa con *parafilm*.
5. Usando un agitador magnético, se mezcla la solución anterior.
6. Se miden  $Y$  *g* de ampicilina trihidratada (10 % *p/p* de ampicilina) y se vierten en la solución anterior mientras se continúa agitando.
7. Cuando se disuelva la ampicilina, se retira el *parafilm* del vaso precipitado y se deja evaporar el diclorometano de la solución por unas horas hasta que disminuya hasta  $\pm 20$  *mL*.



8. Se detiene el agitador, se retira la bala magnética y se vierte la suspensión sobre la placa de petri perfectamente nivelada.
9. Se deja nuevamente evaporando el diclorometano hasta que se forme una película de PLA sobre la placa (mínimo 1 hora de espera). Debería resultar un film translúcido cargado homogéneamente con ampicilina.
10. Se retira cuidadosamente film de la placa. Se recomienda dejar enfriar a 4°C antes de retirar.
11. Sobre una plataforma dura se corta la película extraída en piezas de 1 *cm* x 1 *cm* usando un bisturí.
12. Se almacenan las membranas cuidadosamente en un refrigerador a 4°C.

Tabla A.1: Cantidad de ácido poli-láctico y ampicilina para sintetizar las membranas de distinto espesor y carga.

Espesor membrana [mm]	Cantidad de PLA [gr]	Amp. trihidratada [gr] [gr]
0,1	2,10	0,269
0,33	6,94	0,887

## A.5. Síntesis de las membranas de PLA (PDL02) cargadas con ampicilina

### Materiales

- Ácido poli-láctico *Purasorb* PDL 02
- Diclorometano
- Ampicilina trihidratada
- Vaso precipitado de 50 *mL*
- Agitador magnético y bala magnética
- *Parafilm*
- Balanza digital
- Bisturí
- Placa de Petri de vidrio de 14,7 *cm* de diámetro
- Teflón
- Cinta doble faz
- Tubos Falcon

### Procedimiento

\*\* El procedimiento debe realizarse bajo campana.

1. Se prepara una placa de Petri que tenga un fondo de teflón. Para eso se corta una un trozo de teflón que tenga la forma del fondo de la placa y se pega con cinta doble faz.

2. Se pesan  $X$  g de ácido poli-láctico y se dejan en el vaso precipitado. Los gramos de polímero van a determinar el espesor de la membrana. En la Tabla A.2 las cantidades usadas.
3. Se pesan  $Y$  g de carbonato de calcio y se dejan igualmente en el mismo vaso precipitado.
4. Se miden aproximadamente  $25$  mL de diclorometano y se vierten en el mismo vaso precipitado.
5. Se sumerge una bala magnética en el vaso precipitado y se tapa con *parafilm*.
6. Usando un agitador magnético, se mezcla la solución anterior.
7. Se miden  $Z$  g de ampicilina trihidratada ( $10\%$  p/p de ampicilina para cada caso) y se vierten en la solución anterior mientras se continúa agitando.
8. Se deja agitando por  $5$  min para se disuelva la ampicilina.
9. Se detiene el agitador, se retira la bala magnética y se vierte la suspensión sobre la placa de petri perfectamente nivelada.
10. Se deja nuevamente evaporando el diclorometano hasta que se forme una película de PLA sobre la placa (aproximadamente  $17$  horas de espera). Debería resultar un film translúcido cargado homogéneamente con ampicilina.
11. Se retira cuidadosamente film de la placa. Se recomienda dejar enfriar a  $4^{\circ}\text{C}$  antes de retirar.
12. Sobre una plataforma dura se corta la película extraída en piezas de  $1$  cm x  $1$  cm usando un bisturí.
13. Se almacenan las membranas cuidadosamente en tubos Falcon que se deben almacenar en un refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Tabla A.2: Cantidad de ácido poli-láctico y ampicilina para sintetizar las membranas de distinto espesor y carga.

<b>Espesor membrana</b>	<b>Cantidad de PLA</b>	<b>Amp. trihidratada</b>
<b>[mm]</b>	<b>[gr]</b>	<b>[gr]</b>
0,05	1,05	0,134
0,1	2,10	0,269
0,33	6,94	0,887

## A.6. Liberación *in vitro* de ampicilina desde membranas de $0,1$ mm

DIA 1 (LUNES)

Materiales

- Incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- 105 tubos *falcon* de  $15$  mL.

- 105 membranas.
- 600 *mL* de *buffer* fosfato 0,01 M pH 7.
- Micropipetas de 1000 y 5000  $\mu\text{L}$ .
- 132 *ependorf* de 1,5 *mL*.
- Matraz de 500 *mL*.
- Pinza metálica.
- Probeta.
- Toalla de papel.

#### Procedimiento

1. Se etiquetan 132 tubos *ependorf* de la siguiente forma: m1.1a, m1.1b, m1.2a, m1.2b, m1.3a, m1.3b, ..., m22.1a, m22.1b, m22.2a, m22.2b, m22.3a y m22.3b. Además se rotula la fecha en cada uno.
  2. Se prepara un set de 66 tubos *falcon*. Se etiquetan con la siguiente nomenclatura: m1.1, m1.2, m1.3, ..., m22.1, m22.2, m22.3.
  3. Se vierten 600 *mL* de *buffer* fosfato en el matraz y se deja ambientando en la incubadora a 37 °C.
  4. Se pone una membrana en cada uno de los tubos *falcon* procurando que queden en el fondo del tubo y no se rompan.
  5. Usando una micropipeta de 5000  $\mu\text{L}$ , se vierten 5 *mL* de *buffer* en los tubos m1.1, m1.2, m1.3, ..., m22.1, m22.2, m22.3.
  6. El resto del *buffer* se regresa a la incubadora.
  7. A las 11.30 am se dejan los tubos *falcon* rotulados en la incubadora a 37 °C.
  8. **Se recolectan muestras de los tubos m1.1, m1.2, m1.3 a m22.1, m22.2, m22.3 preparadas este día. El proceso es el siguiente (rápido).**
    - (a) Se sacan de la incubadora los tres tubos a muestrear.
    - (b) De cada tubo se restira cuidadosamente la membrana con una pinza y se deja sobre una hoja de toalla de papel.
    - (c) Se mezcla el *buffer* en el tubo mX.1 y luego se toma 1 *mL*. Se guarda la muestra en el tubo etiquetado como mX.1a.
    - (d) Nuevamente, se mezcla el *buffer*, se toma 1 *mL* y se guarda en el tubo mX.1b.
    - (e) Se repite el procedimiento desde el paso c) al d) para los tubos duplicado y triplicado: mX.2 y mX.3.
    - (f) Los tubos *ependorf* se almacenan en el congelador (-70 °C).
    - (g) Finalmente, las membranas se desechan.
- El orden y tiempos de la recolección están dispuestos en la Tabla A.3.**
9. **Antes de las 14.00 hrs.**
    - (a) Se etiquetan 3 tubos *falcon* con la siguiente nomenclatura: m28.1, m28.2 y m28.3.
    - (b) Se pone una membrana en de los tubos *falcon* procurando que queden en el fondo del tubo y no se rompan.
    - (c) Usando la micropipeta decada uno 5000  $\mu\text{L}$ , se vierte 5 *mL* de *buffer* en los tubos.

Tabla A.3: Tiempos de recolección de las muestras del día 1.

Hora	Tiempo [h]	Muestra		
11.30	0			
11.45	0,25	m1.1	m1.2	m1.3
12.00	0,5	m2.1	m2.2	m2.3
12.15	0,75	m3.1	m3.2	m3.3
12.30	1	m4.1	m4.2	m4.3
12.45	1,25	m5.1	m5.2	m5.3
13.00	1,5	m6.1	m6.2	m6.3
13.15	1,75	m7.1	m7.2	m7.3
13.30	2	m8.1	m8.2	m8.3
13.45	2,25	m9.1	m9.2	m9.3
14.00	2,5	m10.1	m10.2	m10.3
14.15	2,75	m11.1	m11.2	m11.3
14.30	3	m12.1	m12.2	m12.3
15.00	3,5	m13.1	m13.2	m13.3
15.30	4	m14.1	m14.2	m14.3
16.00	4,5	m15.1	m15.2	m15.3
16.30	5	m16.1	m16.2	m16.3
17.00	5,5	m17.1	m17.2	m17.3
17.30	6	m18.1	m18.2	m18.3
18.30	7	m19.1	m19.2	m19.3
19.30	8	m20.1	m20.2	m20.3
20.30	9	m21.1	m21.2	m21.3
21.30	10	m22.1	m22.2	m22.3

(d) A las 14.00 hrs los tubos se dejan en la incubadora a 37 °C.

10. **Antes de las 18.00 hrs.**

- (a) Se etiquetan 33 tubos *falcon* con la siguiente nomenclatura: m23.1, m23.2, m23.3,..., 27.1, m27.2 y m27.3, m29.1, m29.2, m29.3, m30.1, m30.2, m30.3, m31.1, m31.2, m31.2, m33.1, m33.2, m33.3, m35.1, m35.2, m35.3, ..., m37.1, m37.2 y m37.3.
- (b) Se pone una membrana en cada uno de los tubos *falcon* procurando que queden en el fondo del tubo y no se rompan.
- (c) A las 17.55 hrs. se vierten 5 mL de *buffer* en los tubos m35, m36 y m37, y a las 18.00 hrs. se dejan en la incubadora a 37 °C.
- (d) A las 18.55 hrs. se vierten 5 mL de *buffer* en los tubos m30, m31 y m33, y a las 19.00 hrs. se dejan en la incubadora a 37 °C.
- (e) A las 21.45 hrs. se vierten 5 mL de *buffer* en los tubos m23, m24, m25, m26, m27 y m29, y a las 22.00 hrs. se dejan en la incubadora a 37°C.

DIA 2 (MARTES)

Materiales

- Incubadora a 37 °C.
- Congelador a -70 °C.
- 6 tubos *falcon* de 15 mL.
- 6 membranas.
- 40 mL de *buffer* fosfato 0,01 M pH 7.
- Micropipetas de 1000 y 5000 L.
- 42 tubos *ependorf* de 1,5 mL.
- Matraz de 50 ó 100 mL.
- Pinza metálica.
- Probeta.
- Toalla de papel.

Procedimiento

1. Se etiquetan 42 tubos *ependorf* de la siguiente forma: m23.1a, m23.1b, m23.2a, m23.2b, m23.3a, m23.3a,..., m27.1a, m27.1b, 27.2a, 27.2b, m27.3a y m27.3b, m29.1a, m29.1b, 29.2a, 29.2b, m29.3a y m29.3b. Además se rotula la fecha en cada uno.
2. Se prepara un set de 6 tubos *falcon*. Se etiquetan con la siguiente nomenclatura: m32.1, m32.2, m32.3, m34.1, m34.2 y m34.3
3. Se vierten 40 mL de *buffer* fosfato en el matraz y se deja ambientando en la incubadora a 37°C.
4. Se pone una membrana en cada uno de los tubos *falcon* procurando que queden en el fondo del tubo y no se rompan.
5. Usando la micropipeta de 5000 L, se vierten 5 mL de *buffer* en los tubos *falcon*.
6. A las 9.30 am se dejan los tubos *falcon* rotulados en la incubadora a 37 °C.

Tabla A.4: Tiempos de recolección de las muestras del día 2.

Hora	Tiempo [h]	Muestra		
09.00	11	m23.1	m23.2	m23.3
10.00	12	m24.1	m24.2	m24.3
13.00	15	m25.1	m25.2	m25.3
16.00	18	m26.1	m26.2	m26.3
19.00	21	m27.1	m27.2	m27.3
20.00	30	m28.1	m28.2	m28.3
21.00	23	m29.1	m29.2	m29.3

Tabla A.5: Tiempos de recolección de las muestras del día 3.

Hora	Tiempo [h]	Muestra		
13.00	42	m30.1	m30.2	m30.3
19.00	48	m31.1	m31.2	m31.3
20.30	35	m32.1	m32.2	m32.3

7. **Se recolectan muestras de los tubos m23.1, m23.2, m23.3 a m29.1, 29.2, m29.3. El proceso es mismo que para el día 1. El orden y tiempos de la recolección están dispuestos en la Tabla A.4.**

DIA 3 (MIERCOLES)

Materiales

- Congelador a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Micropipeta de 1000 L.
- 18 tubos *ependorf* de 1,5 mL.
- Pinza metálica.
- Toalla de papel.

Procedimiento

1. Se etiquetan 18 tubos ependorf de la siguiente forma: m30.1a, m30.1b, m30.2a, m30.2b, m30.3a, m30.3a,..., m32.1a, m32.1b, 32.2a, m32.2b, m32.3a y m32.3b. Además se les escribe la fecha.
2. **Se recolectan muestras de los tubos m30.1, m30.2, m30.3 a m32.1, 32.2, m32.3. El proceso es mismo que para el día 1.**

El orden y tiempos de la recolección están dispuestos en la Tabla A.5.

DIA 4 (JUEVES)

Materiales

Tabla A.6: Tiempos de recolección de las muestras del día 4.

Hora	Tiempo [h]	Muestra		
19.00	72	m33.1	m33.2	m33.3
21.30	60	m34.1	m34.2	m34.3

- Congelador a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Micropipeta de 1000 *L*.
- 12 tubos *ependorf* de 1,5 *mL*.
- Pinza metálica.
- Toalla de papel.

#### Procedimiento

1. Se etiquetan 12 tubos *ependorf* de la siguiente forma: m33.1a, m33.1b, m33.2a, m33.2b, m33.3a, m33.3a, m34.1a, m34.1b, 34.2a, m34.2b, m34.3a y m34.3b. Además se escribe la fecha en cada uno.
2. **Se recolectan muestras de los tubos m33.1, m33.2, m33.3 a m34.1, 34.2, m34.3. El proceso es mismo que para el día 1.**

**El orden y tiempos de la recolección están dispuestos en la Tabla A.6.**

#### DIA 5 (VIERNES)

##### Materiales

- Congelador a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Micropipeta de 1000 *L*.
- 6 tubos *ependorf* de 1,5 *mL*.
- Pinza metálica.
- Toalla de papel.

#### Procedimiento

1. Se etiquetan 6 tubos *ependorf* de la siguiente forma: m35.1a, m35.1b, m35.2a, m35.2b, m35.3a, m35.3b, además de la fecha.
2. **Se recolectan muestras de los tubos m35.1, m35.2, m35.3 a las 18.00 hrs.**

#### DIA 6 (SABADO)

##### Materiales

- Congelador a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Micropipeta de 1000 *L*.
- 6 tubos *ependorf* de 1,5 *mL*.

- Pinza metálica.
- Toalla de papel.

#### Procedimiento

1. Se etiquetan 6 tubos eppendorf de la siguiente forma: m36.1a, m36.1b, m36.2a, m36.2b, m36.3a, m36.3b, además de la fecha.
2. **Se recolectan muestras de los tubos m36.1, m36.2, m36.3 a las 18.00 hrs.**

#### DIA 7 (DOMINGO)

#### Materiales

- Congelador a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Micropipeta de 1000  $L$ .
- 6 tubos eppendorf de 1,5  $mL$ .
- Pinza metálica.
- Toalla de papel.

#### Procedimiento

1. Se etiquetan 6 tubos eppendorf de la siguiente forma: m37.1a, m37.1b, m37.2a, m37.2b, m37.3a, m37.3b, además de la fecha.
2. **Se recolectan muestras de los tubos m37.1, m37.2, m37.3 a la 18.00 hrs.**

## A.7. Preparación de las muestras y operación del equipo HPLC

#### Materiales

- Potasio di-hidrógeno fosfato ( $KH_2PO_4$ )
- Acetonitrilo 100 % grado HPLC ( $CH_3CN$ )
- Metanol 100 % grado HPLC ( $CH_3OH$ )
- Agua desionizada Milli Q
- Ampicilina trihidratada
- Filtros Advantec
- Filtros Millipore  $\mu m$
- Vials
- Septums
- Vial caps
- Jeringa de 1  $ml$



- Soportes para filtro Advantec y filtro Millipore
- Matraz de 1 litro
- Botella de tapa azul de 1 litro
- Bomba de vacío
- Ultrasonicador

## Procedimiento

1. Preparación de la solución fase móvil (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01M:CH<sub>3</sub>CN:CH<sub>3</sub>OH=70:19:11)
  - (a) Se miden 0,952 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y se dejan en el matraz de 1 litro.
  - (b) Se adicionan 700 ml agua desionizada y se agita con el agitador magnético. Se logra una solución 0,01 M.
  - (c) Se miden 190 ml de acetonitrilo y se vierte en la solución de fosfato. Se continúa agitando.
  - (d) Se miden 110 ml de metanol y se vierten en la solución anterior. Se continúa agitando por unos minutos.
  - (e) Se filtra la solución preparada con un filtro Advantec usando el soporte para ello y la bomba de vacío. Se vierte la solución filtrada en una botella de tapa azul de 1 litro.
  - (f) Se desgasifica la solución en el ultrasonicador durante 5 minutos.
2. Obtención de la curva estándar.
  - (a) Se inyectan distintos volúmenes de la muestra estándar de antibiótico para conformar la curva de calibración.
  - (b) Todas las muestras se inyectan mínimo en duplicado.
3. Preparación de las muestras.
  - (a) Las muestras de las experiencias están congeladas. Se dejan a temperatura ambiente hasta descongelar.
  - (b) Con la jeringa se toma una muestra, se pasa por el filtro Millipore (puesto en el soporte correspondiente) y se deposita en un vial. Se tapa el vial con el septum y el vial cap.
  - (c) Se deja la muestra en el muestreador del equipo HPLC.
4. Condiciones del HPLC para el análisis de las muestras con ampicilina.
  - Fase estacionaria: LiChrospher 100 RP-18
  - Fase móvil: 0,01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:CH<sub>3</sub>CN:CH<sub>3</sub>OH (70:19:11)
  - Velocidad del flujo: 0,4 ml/min
  - Temperatura: 25°C
  - Longitud de onda para el sensor UV = 225 nm.
  - Volumen inyectado por muestra: 50  $\mu$ L.
  - Tiempo de inicio: 0 min.
  - Tiempo de detención: 6 min.
5. Operación del equipo de HPLC.
  - (a) Encender el equipo. Primero el estabilizador de voltaje, luego el controlador y finalmente el resto.

- (b) Encender el computador y abrir el programa LC system (opción 1).
- (c) System configuration.
- (d) System check.
- (e) Data acquisition/Advanced.
- (f) Purgar la bomba A1 (3 min) y el autosampler (15 min).
- (g) Ambientar las líneas y la columna con la fase móvil (5 min).
- (h) Base line check. Asegurarse que esté prendido el sensor UV (D2).
- (i) Single Run o Batch Processing (usando las condiciones fijadas en el punto 4).
- (j) Shutdown. Esta opción permite que programar el equipo para que se apague una vez que se termina de tomar muestras. Seleccionar el programa por 60 min.

Fin de uso:

1. Se purgan las líneas y el autosampler con agua mili Q.
2. Se purgan las líneas y el autosampler con acetonitrilo:agua (20:80).
3. Se lava la columna con una solución de acetonitrilo:agua (20:80) por 25 min.
4. Se purgan las líneas y el autosampler con acetonitrilo.
5. Se lava la columna con acetonitrilo por 25 min.
6. Se retira la columna y se unen las líneas con una “unión cero”.
7. Se purgan las líneas y el autosampler con metanol.
8. Se deben dejar las líneas con metanol grado HPLC.

## Anexo B

# Ejemplo de cálculo para la cuantificación de ampicilina en una muestra experimental

Se usará los resultados asociados a la membrana m3.3 de la experiencia de liberación de ampicilina desde las membranas de 0,05 mm y PDL02 para ejemplificar la cuantificación de las muestras. Cada membrana fue sumergida en 5 mL de *buffer* se tomaron dos muestras de este último, en este caso, etiquetadas como m3.3a y m3.3b. A continuación se muestra el cromatograma de la muestra 3.3b:

El *peak* de absorbancia correspondiente a la ampicilina es el tercero, que tiene un tiempo de retención que comúnmente es 3,68 [min], aproximadamente. El área del pick lo estima automáticamente el *software* LCsolution Workstation. Para la muestra m3.3 el área es 6.182.844[mV – min]. Usando la Ecuación 4.1 obtenida de la curva de calibración se estima la concentración de ampicilina en la muestra 3.3b.

Para la muestra m3.3b,  $y = 6.182.844 [mV - min]$ , por lo tanto,  $x = 0,0549 [mg/mL]$ .

Este es el mecanismo de cálculo para todas las muestras de la experiencia de liberación *in vitro*, sólo que se usa la Ecuación 4.1.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\Documents and Settings\Laboratorio\Escritorio\Feña\Xime\pd102-005\p3.3b.lcd  
Acquired by : Admin  
Sample Name : p3.3  
Sample ID : p3.3b  
Tray# : 1  
Vial # : 38  
Injection Volume : 50 uL  
Data File Name : p3.3b.lcd  
Method File Name : Ampicilina.lcm  
Batch File Name : Batch cal + prueba1.lcb  
Report File Name : Default.lcr  
Data Acquired : 26/11/2014 23:27:09  
Data Processed : 26/11/2014 23:33:11

<Chromatogram>

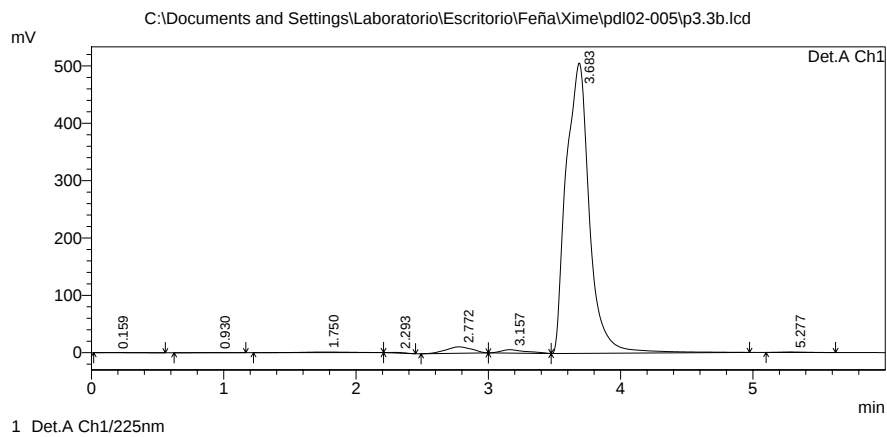


Figura B.1: Reporte de medición entregado por el equipo de RT-HPLC para la muestra m3.3b para el experimento de liberación de la membrana PDL02-005.

# Anexo C

## Datos experimentales

A continuación, en la Tabla C.1 se muestran los datos obtenidos para determinar la curva de calibración usada para este trabajo.

Tabla C.1: Datos para la construcción de la curva de calibración área [mV-min] v/s concentración [mg/mL].

muestra	volumen (uL)	concentracion (mg/mL)	masa (ug)	area
10	50	0,1	5	10990435
1	50	0,06	3	6804260
2	50	0,036	1,8	4215618
3	50	0,0216	1,08	2647999
4	50	0,01296	0,648	1657132
5	50	0,007776	0,3888	1056492
6	50	0,0046656	0,23328	689388
7	50	0,00279936	0,139968	504373
8	50	0,001679616	0,0839808	381140
9	50	0,00100777	0,05038848	291288

Con la curva de calibración es posible obtener los datos de concentración de las distintas muestras obtenidas durante las experiencias de liberación para las distintas membranas elaboradas. De este modo el primer resultado que se muestra es del experimento de liberación de la membrana PDL04-01.

Tabla C.2: Datos de la experiencia de liberación de ampicilina desde las membranas de PDL04 y 0,1 mm de espesor. Solución usada: buffer fosfato 0,01M a pH 7 y 37°C

	Muestra	Area [mV-min]		Concentración Ampicilina [mg/ml]				Promedio	SD
		a	b	a	b	Promedio	SD		
0	0	0	0	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0
0,25	m1.1	3372262	2576296	0,054	0,040	0,047	0,939725	0,046	0,002
	m1.2	2925952	2625380	0,046	0,041	0,044	0,354858		
	m1.3	2896445	2893671	0,046	0,046	0,046	0,003275		
0,5	m2.1	2434028	2635104	0,038	0,041	0,040	0,237392	0,042	0,015
	m2.2	1785599	2013070	0,027	0,031	0,029	0,268554		
	m2.3	3151860	4137052	0,050	0,067	0,058	1,163127		
0,75	m3.1	3420180	3305300	0,055	0,053	0,054	0,135628	0,042	0,010
	m3.2	2493267	2507938	0,039	0,039	0,039	0,017321		
	m3.3	2154650	2222556	0,033	0,035	0,034	0,08017		
1	m4.1	2431505	2629702	0,038	0,041	0,040	0,233993	0,038	0,003
	m4.2	2431243	2647083	0,038	0,042	0,040	0,254823		
	m4.3	2084374	2307330	0,032	0,036	0,034	0,263224		
1,25	m5.1	2884773	3049294	0,046	0,048	0,047	0,194235	0,043	0,004
	m5.2	2437419	2537441	0,038	0,040	0,039	0,118087		
	m5.3	2432414	2974243	0,038	0,047	0,043	0,639688		

	Muestra	Área [mV·min]		Concentración Ampicilina [mg/ml]				Promedio	SD
		a	b	a	b	Promedio	SD		
1,5	m6.1	1861537	2196629	0,029	0,034	0,031	0,395613	0,046	0,018
	m6.2	2654170	2590891	0,042	0,041	0,041	0,074708		
	m6.3	4115651	4192516	0,066	0,067	0,067	0,090748		
1,75	m7.1	2687303	2876828	0,042	0,046	0,044	0,223755	0,039	0,005
	m7.2	2392357	1931503	0,037	0,030	0,034	0,544089		
	m7.3	2532208	2482935	0,040	0,039	0,039	0,058172		
2	m8.1	2754405	3557800	0,043	0,057	0,050	0,948496	0,046	0,006
	m8.2	2936020	3128580	0,046	0,050	0,048	0,227338		
	m8.3	3128580	1933008	0,050	0,030	0,040	1,411504		
2,25	m9.1	1697235	1964275	0,026	0,030	0,028	0,31527	0,078	0,048
	m9.2	7650772	7369592	0,125	0,121	0,123	0,331964		
	m9.3	4939510	5395583	0,080	0,088	0,084	0,538444		
2,5	m10.1	6373449	6809492	0,104	0,111	0,108	0,514797	0,105	0,011
	m10.2	5433058	5934494	0,088	0,097	0,092	0,592		
	m10.3	6965086	7075806	0,114	0,116	0,115	0,130717		
2,75	m11.1	5501779	6306326	0,089	0,103	0,096	0,949856	0,091	0,063
	m11.2	1581407	1755878	0,024	0,027	0,025	0,205982		
	m11.3	10117797	8322214	0,166	0,136	0,151	2,119882		
3	m12.1	3383270	3587093	0,054	0,057	0,056	0,240635	0,086	0,026
	m12.2	6009541	6203239	0,098	0,101	0,099	0,228682		
	m12.3	6184476	6371779	0,101	0,104	0,102	0,221132		
3,5	m13.1	4502854	6546994	0,073	0,107	0,090	2,413331	0,075	0,035
	m13.2	6101151	6172417	0,099	0,101	0,100	0,084137		
	m13.3	2064738	2338715	0,032	0,037	0,034	0,32346		
4	m14.1	7008324	7439111	0,114	0,122	0,118	0,508591	0,115	0,006
	m14.2	6649328	6555665	0,108	0,107	0,108	0,110579		
	m14.3	7188681	7411434	0,118	0,121	0,119	0,262984		
4,5	m15.1	10300575	10351398	0,169	0,170	0,170	0,060002	0,151	0,026
	m15.2	7180427	7722919	0,117	0,126	0,122	0,640471		
	m15.3	9920946	9804811	0,163	0,161	0,162	0,13711		
5	m16.1	7238779	7300680	0,118	0,119	0,119	0,073081	0,140	0,055
	m16.2	11108594	13415120	0,183	0,221	0,202	2,723107		
	m16.3	5773373	6314325	0,094	0,103	0,098	0,638653		
5,5	m17.1	8597487	11144118	0,141	0,184	0,162	3,006577	0,106	0,067
	m17.2	1964854	2209824	0,030	0,034	0,032	0,289214		
	m17.3	7425354	7751567	0,121	0,127	0,124	0,38513		
6	m18.1	7011427	7628675	0,115	0,125	0,120	0,728729	0,159	0,045
	m18.2	8938722	9251911	0,147	0,152	0,149	0,369754		
	m18.3	10742554	14549580	0,177	0,240	0,209	4,494611		
7	m19.1	7586975	7734010	0,124	0,127	0,125	0,173591	0,133	0,022
	m19.2	8003683	11184902	0,131	0,184	0,158	3,755777		
	m19.3	7882421	6360317	0,129	0,104	0,116	1,79701		
8	m20.1	7114148	7366619	0,116	0,120	0,118	0,29807	0,162	0,070
	m20.2	7385764	7708604	0,121	0,126	0,123	0,381148		
	m20.3	12773084	16600044	0,211	0,275	0,243	4,518145		
9	m21.1	15408790	15623427	0,255	0,258	0,257	0,253402	0,185	0,069
	m21.2	10403347	11613406	0,171	0,191	0,181	1,428607		
	m21.3	6908190	7540620	0,113	0,123	0,118	0,746653		
10	m22.1	10451417	14322329	0,172	0,237	0,204	4,570036	0,177	0,047
	m22.2	7146319	7815745	0,117	0,128	0,122	0,790331		
	m22.3	12368219	12389560	0,204	0,204	0,204	0,025195		
11	m23.1	3299184	3804448	0,053	0,061	0,057	0,596519		
	m23.2	10896641	11323853	0,179	0,187	0,183	0,504371		
	m23.3	3731412	4052573	0,060	0,065	0,062	0,379166		
12	m24.1	4503830	3741231	0,073	0,060	0,066	0,900332	0,072	0,009
	m24.2	4966182	4752976	0,080	0,077	0,079	0,251713		
	m24.3	2764645	2892561	0,044	0,046	0,045	0,151019		
15	m25.1	6770736	7227140	0,111	0,118	0,114	0,538835	0,102	0,011
	m25.2	6066696	5656311	0,099	0,092	0,095	0,484504		
	m25.3	5935506	5760897	0,097	0,094	0,095	0,206145		
18	m26.1	5828260	4472479	0,095	0,072	0,083	1,600648	0,126	0,047
	m26.2	342122	10900661	0,003	0,179	0,091	12,46551		
	m26.3	10148510	10293922	0,167	0,169	0,168	0,171675		
21	m27.1	4822238	5173053	0,078	0,084	0,081	0,414176	0,081	0,015
	m27.2	3812141	4306660	0,061	0,069	0,065	0,583834		
	m27.3	5820148	5988919	0,095	0,097	0,096	0,199253		
30	m28.1	10219807	10658988	0,168	0,175	0,172	0,518501		0,050
	m28.2	13830069	18000247	0,228	0,298	0,263	4,923352		
	m28.3	17510540	13124687	0,290	0,217	0,253	5,17798		
23	m29.1	4655421	4528093	0,075	0,073	0,074	0,150325	0,082	0,019
	m29.2	6300790	6440041	0,103	0,105	0,104	0,164401		
	m29.3	4522464	4095848	0,073	0,066	0,069	0,503667		
42	m30.1	9235464	7820066	0,152	0,128	0,140	1,671032	0,083	0,049
	m30.2	3448313	3782508	0,055	0,061	0,058	0,394554		
	m30.3	3346191	3202071	0,053	0,051	0,052	0,170149		
48	m31.1	7085272	5548126	0,116	0,090	0,103	1,814769	0,099	0,044
	m31.2	8897669	8375193	0,146	0,137	0,142	0,61684		
	m31.3	2714268	3990529	0,043	0,064	0,053	1,506766		
35	m32.1	7585326	7771443	0,124	0,127	0,126	0,219732	0,109	0,033
	m32.2	4305871	4500773	0,069	0,073	0,071	0,230103		
	m32.3	8856268	6898578	0,145	0,113	0,129	2,311267		
72	m33.1	4333385	3340848	0,070	0,053	0,062	1,171799	0,089	0,024
	m33.2	5334242	7585691	0,087	0,124	0,105	2,658082		
	m33.3	6036191	6384355	0,098	0,104	0,101	0,411046		
74.5	m34.1	6883045	7091247	0,112	0,116	0,114	0,245805	0,103	0,015
	m34.2	6490165	6846405	0,106	0,112	0,109	0,42058		
	m34.3	5509863	5096820	0,089	0,083	0,086	0,487642		
96	m35.1	10656657	10850738	0,175	0,179	0,177	0,229134	0,149	0,026
	m35.2	9964473	7432094	0,164	0,122	0,143	2,989751		
	m35.3	8174672	7314283	0,134	0,120	0,127	1,015783		
120	m36.1	7997163	11037430	0,131	0,182	0,156	3,589368	0,154	0,025
	m36.2	8953281	6691292	0,147	0,109	0,128	2,670526		
	m36.3	11200355	10292367	0,184	0,169	0,177	1,071979		

	Muestra	Area [mV-min]		Concentración Ampicilina [mg/ml]				Promedio	SD
		a	b	a	b	Promedio	SD		
144	m37.1	8416049	7616612	0,138	0,125	0,131	0,943823	0,159	0,028
	m37.2	10263353	9053870	0,169	0,149	0,159	1,427927		
	m37.3	11857495	10902045	0,195	0,180	0,187	1,128013		

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para PDL04-033.

Tabla C.4: Datos de la experiencia de liberación de ampicilina desde las membranas de PDL04 y 0,33 mm de espesor. Solución usada: buffer fosfato 0,01M a pH 7 y 37°C

	Muestra	Area [mV-min]		Concentración Ampicilina [mg/ml]				Promedio	SD
		a	b	a	b	Promedio	SD		
0	0	0	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,25	m1.1	551999	524322	0,0030	0,0027	0,0029	0,0002	0,0027	0,0002
	m1.2	534069	553545	0,0028	0,0030	0,0029	0,0001		
	m1.3	461119	530131	0,0021	0,0028	0,0025	0,0004		
0,5	m2.1	716269	589332	0,0045	0,0033	0,0039	0,0008	0,0042	0,0011
	m2.2	586350	598403	0,0033	0,0034	0,0034	0,0001		
	m2.3	818543	809655	0,0054	0,0054	0,0054	0,0001		
0,75	m3.1	540960	849030	0,0029	0,0057	0,0043	0,0020	0,0027	0,0019
	m3.2	574386		0,0032	-0,0021	0,0005	0,0037		
	m3.3	565799	581417	0,0031	0,0033	0,0032	0,0001		
1	m4.1	916501	700601	0,0063	0,0044	0,0053	0,0014	0,0048	0,0012
	m4.2	497112	711369	0,0025	0,0045	0,0035	0,0014		
	m4.3	730570	962794	0,0046	0,0068	0,0057	0,0015		
1,25	m5.1	615998	563864	0,0036	0,0031	0,0033	0,0003	0,0048	0,0028
	m5.2	482413	642586	0,0023	0,0038	0,0031	0,0010		
	m5.3	1111363	1106150	0,0081	0,0081	0,0081	0,0000		
1,5	m6.1	785405	790408	0,0051	0,0052	0,0052	0,0000	0,0045	0,0011
	m6.2	540230	631253	0,0029	0,0037	0,0033	0,0006		
	m6.3	883031	687552	0,0060	0,0042	0,0051	0,0013		
1,75	m7.1	578060	638592	0,0032	0,0038	0,0035	0,0004	0,0036	0,0007
	m7.2	658496	748104	0,0040	0,0048	0,0044	0,0006		
	m7.3	542518	564171	0,0029	0,0031	0,0030	0,0001		
2	m8.1	866878	672963	0,0059	0,0041	0,0050	0,0013	0,0043	0,0007
	m8.2	588330	841508	0,0033	0,0057	0,0045	0,0017		
	m8.3	603724	619005	0,0035	0,0036	0,0035	0,0001		
2,25	m9.1	830215	991881	0,0055	0,0070	0,0063	0,0011	0,0056	0,0007
	m9.2	649720	866682	0,0039	0,0059	0,0049	0,0014		
	m9.3	858996	801313	0,0058	0,0053	0,0055	0,0004		
2,5	m10.1	1013707	1210665	0,0072	0,0091	0,0081	0,0013	0,0067	0,0024
	m10.2	1074954	1138243	0,0078	0,0084	0,0081	0,0004		
	m10.3	567195	752177	0,0031	0,0048	0,0040	0,0012		
2,75	m11.1	738772	664603	0,0047	0,0040	0,0044	0,0005	0,0034	0,0028
	m11.2	517237		0,0027	-0,0021	0,0003	0,0034		
	m11.3	726861	935414	0,0046	0,0065	0,0056	0,0014		
3	m12.1	996190	725441	0,0071	0,0046	0,0058	0,0018	0,0051	0,0022
	m12.2	960992	986405	0,0068	0,0070	0,0069	0,0002		
	m12.3	506306	523800	0,0026	0,0027	0,0026	0,0001		
3,5	m13.1	643665	656490	0,0038	0,0039	0,0039	0,0001	0,0039	0,0007
	m13.2	618505	824259	0,0036	0,0055	0,0045	0,0013		
	m13.3	552102	582290	0,0030	0,0033	0,0031	0,0002		
4	m14.1	831557	597291	0,0056	0,0034	0,0045	0,0015	0,0072	0,0036
	m14.2	968392	732811	0,0068	0,0046	0,0057	0,0015		
	m14.3	1715201	1194942	0,0137	0,0089	0,0113	0,0034		
4,5	m15.1	760842	483404	0,0049	0,0023	0,0036	0,0018	0,0032	0,0006
	m15.2	592204	610240	0,0034	0,0035	0,0034	0,0001		
	m15.3	614667	391918	0,0036	0,0015	0,0025	0,0015		
5	m16.1	474015	488149	0,0023	0,0024	0,0023	0,0001	0,0030	0,0008
	m16.2	552093	542719	0,0030	0,0029	0,0029	0,0001		
	m16.3	678927	618629	0,0042	0,0036	0,0039	0,0004		
5,5	m17.1	549787	379596	0,0030	0,0014	0,0022	0,0011	0,0026	0,0004
	m17.2	604691	449373	0,0035	0,0020	0,0028	0,0010		
	m17.3	656525	440252	0,0039	0,0020	0,0029	0,0014		
6	m18.1	879871	865814	0,0060	0,0059	0,0059	0,0001	0,0037	0,0019
	m18.2	575839	458408	0,0032	0,0021	0,0027	0,0008		
	m18.3	438571	561356	0,0019	0,0031	0,0025	0,0008		
7	m19.1	507043	459672	0,0026	0,0021	0,0023	0,0003	0,0025	0,0002
	m19.2	428221	611269	0,0018	0,0035	0,0027	0,0012		
	m19.3	565162	413605	0,0031	0,0017	0,0024	0,0010		
8	m20.1	563429	496551	0,0031	0,0025	0,0028	0,0004	0,0030	0,0002
	m20.2	661581	494045	0,0040	0,0024	0,0032	0,0011		
	m20.3	562486	526550	0,0031	0,0027	0,0029	0,0002		
9	m21.1	458992	410629	0,0021	0,0017	0,0019	0,0003	0,0038	0,0021
	m21.2	492269	704144	0,0024	0,0044	0,0034	0,0014		
	m21.3	875263	875263	0,0060	0,0060	0,0060	0,0000		
10	m22.1	727930	510673	0,0046	0,0026	0,0036	0,0014	0,0041	0,0009
	m22.2	782278	784127	0,0051	0,0051	0,0051	0,0000		
	m22.3	661965	587094	0,0040	0,0033	0,0037	0,0005		
11	m23.1	888007	570142	0,0061	0,0031	0,0046	0,0021	0,0035	0,0013
	m23.2	646010	637849	0,0038	0,0038	0,0038	0,0001		
	m23.3	448454	463429	0,0020	0,0022	0,0021	0,0001		

	Muestra	Área [mV·min]		Concentración Ampicilina [mg/ml]				Promedio	SD
		a	b	a	b	Promedio	SD		
12	m24.1	323803	537216	0,0009	0,0028	0,0019	0,0014	0,0015	0,0009
	m24.2	277976	275703	0,0005	0,0004	0,0004	0,0000		
	m24.3	480541	461500	0,0023	0,0021	0,0022	0,0001		
15	m25.1	600677	860811	0,0034	0,0058	0,0046	0,0017	0,0050	0,0012
	m25.2	642557	686394	0,0038	0,0038	0,0040	0,0003		
	m25.3	854721	993453	0,0058	0,0071	0,0064	0,0009		
18	m26.1	695532	616305	0,0043	0,0036	0,0039	0,0005	0,0049	0,0012
	m26.2	930022	868762	0,0065	0,0059	0,0062	0,0004		
	m26.3	715162	726796	0,0045	0,0046	0,0045	0,0001		
21	m27.1	570429	754242	0,0032	0,0048	0,0040	0,0012	0,0043	0,0010
	m27.2	970028	668581	0,0068	0,0041	0,0054	0,0020		
	m27.3	702492	529450	0,0044	0,0028	0,0036	0,0011		
30	m28.1	526838	545606	0,0027	0,0029	0,0028	0,0001	0,0034	0,0005
	m28.2	605532	650157	0,0035	0,0039	0,0037	0,0003		
	m28.3	630921	604823	0,0037	0,0035	0,0036	0,0002		
23	m29.1	675452	773958	0,0041	0,0050	0,0046	0,0006	0,0041	0,0004
	m29.2	633555	659951	0,0037	0,0040	0,0039	0,0002		
	m29.3	660866	641502	0,0040	0,0038	0,0039	0,0001		
42	m30.1	754817	769915	0,0049	0,0050	0,0049	0,0001	0,0040	0,0008
	m30.2	726524	544029	0,0046	0,0029	0,0037	0,0012		
	m30.3	535370	647505	0,0028	0,0039	0,0033	0,0007		
48	m31.1	414569	610829	0,0017	0,0035	0,0026	0,0013	0,0040	0,0013
	m31.2	639138	723350	0,0038	0,0046	0,0042	0,0005		
	m31.3	1116256	484112	0,0082	0,0024	0,0053	0,0041		
35	m32.1	548189	711854	0,0029	0,0045	0,0037	0,0011	0,0045	0,0010
	m32.2	608698	1061117	0,0035	0,0077	0,0056	0,0029		
	m32.3	577248	808983	0,0032	0,0054	0,0043	0,0015		
72	m33.1	1097596	682096	0,0080	0,0042	0,0061	0,0027	0,0043	0,0024
	m33.2	401087	396030	0,0016	0,0015	0,0016	0,0000		
	m33.3	899648	700439	0,0062	0,0044	0,0053	0,0013		
74.5	m34.1	980154	1062461	0,0069	0,0077	0,0073	0,0005	0,0071	0,0018
	m34.2	1273897	1069258	0,0096	0,0078	0,0087	0,0013		
	m34.3	796868	783152	0,0052	0,0051	0,0052	0,0001		
96	m35.1	2408473	3230123	0,0201	0,0277	0,0239	0,0054	0,0120	0,0103
	m35.2	886068	960802	0,0061	0,0068	0,0064	0,0005		
	m35.3	864975	861670	0,0059	0,0058	0,0059	0,0000		
120	m36.1	709142	754496	0,0044	0,0048	0,0046	0,0003	0,0100	0,0084
	m36.2	2347034	2357959	0,0195	0,0196	0,0196	0,0001		
	m36.3	871675	809261	0,0059	0,0054	0,0056	0,0004		
144	m37.1	2133753	2189211	0,0176	0,0181	0,0178	0,0004	0,0164	0,0050
	m37.2	1641360	1169200	0,0130	0,0087	0,0108	0,0031		
	m37.3	2466508	2466508	0,0206	0,0206	0,0206	0,0000		

Los resultados para PDL02-005 se presentan a continuación. Cabe mencionar que aquí sólo se realizó una toma de muestra hasta el punto 36 ya que no se obtuvo una cantidad suficiente de membranas para completar el experimento.

Tabla C.6: Datos de la experiencia de liberación de ampicilina desde las membranas de PDL02 y 0,05 mm de espesor. Solución usada: buffer fosfato 0,01M a pH 7 y 37°C

	Muestra	Área [mV·min]		Concentración Ampicilina [mg/ml]				Promedio	SD
		a	b	a	b	Promedio	SD		
0	0	0	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,25	m1.1	6805185	6870566	0,0606	0,0612	0,0609	0,0004	0,0515	0,0082
	m1.2	5323932	5314832	0,0470	0,0469	0,0469	0,0001		
	m1.3	5297310	5273056	0,0467	0,0465	0,0466	0,0002		
0,5	m2.1	7475046	7493463	0,0668	0,0670	0,0669	0,0001	0,0598	0,0176
	m2.2	4540454	4549014	0,0398	0,0398	0,0398	0,0001		
	m2.3	8129994	8117593	0,0728	0,0727	0,0728	0,0001		
0,75	m3.1	8019320	7862401	0,0718	0,0704	0,0711	0,0010	0,0499	0,0242
	m3.2	2783327	2770604	0,0236	0,0234	0,0235	0,0001		
	m3.3	6216565	6182844	0,0552	0,0549	0,0551	0,0002		
1	m4.1	5394942	5354097	0,0476	0,0473	0,0474	0,0003	0,0627	0,0197
	m4.2	6245061	6298490	0,0555	0,0560	0,0557	0,0003		
	m4.3	9440957	9445435	0,0849	0,0850	0,0850	0,0000		
1,25	m5.1	4834206	4750980	0,0425	0,0417	0,0421	0,0005	0,0354	0,0237
	m5.2	1220781	1204264	0,0091	0,0090	0,0091	0,0001		
	m5.3	6193165	6177534	0,0550	0,0548	0,0549	0,0001		
1,5	m6.1	6446290	6274017	0,0573	0,0557	0,0565	0,0011	0,0409	0,0305
	m6.2	6825197	6734233	0,0608	0,0600	0,0604	0,0006		
	m6.3	854367	829983	0,0058	0,0055	0,0057	0,0002		
1,75	m7.1	1870933	1914369	0,0151	0,0155	0,0153	0,0003	0,0438	0,0248
	m7.2	6257024	6285692	0,0556	0,0558	0,0557	0,0002		
	m7.3	6799813	6747004	0,0606	0,0601	0,0603	0,0003		
2	m8.1	9068994	9090074	0,0815	0,0817	0,0816	0,0001	0,0510	0,0374
	m8.2	6918092	7015923	0,0617	0,0626	0,0621	0,0006		
	m8.3	1240293	1245848	0,0093	0,0094	0,0094	0,0000		



	Muestra	Área [mV·min]		Concentración Ampicilina [mg/ml]				Promedio	SD
		a	b	a	b	Promedio	SD		
2,25	m9.1	3717176	3705437	0,0322	0,0321	0,0321	0,0001	0,0339	0,0038
	m9.2	3621375	3618962	0,0313	0,0313	0,0313	0,0000		
	m9.3	4353186	4393952	0,0380	0,0384	0,0382	0,0003		
2,5	m10.1	4981061	5489010	0,0438	0,0485	0,0462	0,0033	0,0422	0,0094
	m10.2	5533103	5544826	0,0489	0,0490	0,0490	0,0001		
	m10.3	5544826	1744601	0,0490	0,0140	0,0315	0,0248		
2,75	m11.1	2304323	2323546	0,0191	0,0193	0,0192	0,0001	0,0235	0,0054
	m11.2	2584476	2560228	0,0217	0,0215	0,0216	0,0002		
	m11.3	3432700	3428668	0,0295	0,0295	0,0295	0,0000		
3	m12.1	3472256	3465436	0,0299	0,0298	0,0299	0,0000	0,0390	0,0217
	m12.2	2773534	2750846	0,0235	0,0233	0,0234	0,0001		
	m12.3	7191494	7114116	0,0642	0,0635	0,0638	0,0005		
3,5	m13.1	2991886	2992153	0,0255	0,0255	0,0255	0,0000	0,0249	0,0104
	m13.2	1782476	1766354	0,0143	0,0142	0,0143	0,0001		
	m13.3	4039309	4014598	0,0351	0,0349	0,0350	0,0002		
4	m14.1	2622819	2611670	0,0221	0,0220	0,0220	0,0001	0,0344	0,0234
	m14.2	6928356	6854406	0,0618	0,0611	0,0614	0,0005		
	m14.3	2375093	2361623	0,0198	0,0197	0,0197	0,0001		
4,5	m15.1	2845248	2856972	0,0241	0,0242	0,0242	0,0001	0,0325	0,0074
	m15.2	4057089	3979405	0,0353	0,0346	0,0349	0,0005		
	m15.3	4382517	4374246	0,0383	0,0382	0,0383	0,0001		
5	m16.1	5377156	5455225	0,0475	0,0482	0,0478	0,0005	0,0526	0,0239
	m16.2	8755714	8739170	0,0786	0,0785	0,0785	0,0001		
	m16.3	3662123	3629628	0,0317	0,0314	0,0315	0,0002		
5,5	m17.1	3954777	4000707	0,0344	0,0348	0,0346	0,0003	0,0304	0,0065
	m17.2	2731603	2691900	0,0231	0,0227	0,0229	0,0003		
	m17.3	3886115	3875258	0,0337	0,0336	0,0337	0,0001		
6	m18.1	3582872	3544833	0,0309	0,0306	0,0307	0,0002	0,0344	0,0040
	m18.2	3892626	3873779	0,0338	0,0336	0,0337	0,0001		
	m18.3	4430453	4431074	0,0387	0,0387	0,0387	0,0000		
7	m19.1	4515681	4506128	0,0395	0,0394	0,0395	0,0001	0,0418	0,0207
	m19.2	7065664	7183258	0,0630	0,0641	0,0636	0,0008		
	m19.3	2658729	2670201	0,0224	0,0225	0,0225	0,0001		
8	m20.1	103298	99933	-0,0012	-0,0012	-0,0012	0,0000	-0,0011	0,0001
	m20.2	121420	121410	-0,0010	-0,0010	-0,0010	0,0000		
	m20.3	103995	103745	-0,0011	-0,0012	-0,0011	0,0000		
9	m21.1	103745	5095303	-0,0012	0,0449	0,0219	0,0325	0,0366	0,0129
	m21.2	5159669	5122439	0,0455	0,0451	0,0453	0,0002		
	m21.3	4871076	4857082	0,0428	0,0427	0,0427	0,0001		
10	m22.1	9148613	9149242	0,0822	0,0822	0,0822	0,0000	0,0873	0,0202
	m22.2	12114549	12089861	0,1096	0,1094	0,1095	0,0002		
	m22.3	7838750	7830300	0,0702	0,0701	0,0701	0,0001		
11	m23.1	5387833	5321583	0,0476	0,0470	0,0473	0,0004	0,0577	0,0128
	m23.2	8020135	8043619	0,0718	0,0721	0,0719	0,0002		
	m23.3	6189775	5970654	0,0550	0,0529	0,0539	0,0014		
12	m24.1	9466443	9577735	0,0852	0,0862	0,0857	0,0007	0,0766	0,0256
	m24.2	10695983	10684760	0,0965	0,0964	0,0965	0,0001		
	m24.3	5396886	5420795	0,0476	0,0479	0,0478	0,0002		
15	m25.1	10718265	10696585	0,0967	0,0965	0,0966	0,0001	0,0915	0,0125
	m25.2	8574370	8654583	0,0769	0,0777	0,0773	0,0005		
	m25.3	11155977	11128002	0,1007	0,1005	0,1006	0,0002		
18	m26.1	10795010	10796423	0,0974	0,0974	0,0974	0,0000	0,0735	0,0444
	m26.2	11260686	11081118	0,1017	0,1001	0,1009	0,0012		
	m26.3	2653176	2647088	0,0224	0,0223	0,0223	0,0000		
21	m27.1	7236994	7173596	0,0646	0,0640	0,0643	0,0004	0,0810	0,0208
	m27.2	8293474	8305947	0,0744	0,0745	0,0744	0,0001		
	m27.3	11520246	11565941	0,1041	0,1045	0,1043	0,0003		
30	m28.1	8976886	9013981	0,0807	0,0810	0,0808	0,0002	0,0774	0,0050
	m28.2	8867136	8913288	0,0796	0,0801	0,0799	0,0003		
	m28.3	8000146	8000229	0,0717	0,0717	0,0717	0,0000		
23	m29.1	8259365	8256319	0,0740	0,0740	0,0740	0,0000	0,0939	0,0173
	m29.2	11656115	11678228	0,1054	0,1056	0,1055	0,0001		
	m29.3	11208801	11415547	0,1012	0,1031	0,1022	0,0013		
42	m30.1	12726810	12863637	0,1152	0,1165	0,1159	0,0009	0,0866	0,0255
	m30.2	7723926	7698500	0,0691	0,0689	0,0690	0,0002		
	m30.3	8358556	8337304	0,0750	0,0748	0,0749	0,0001		
48	m31.1	10651704	10444670	0,0961	0,0942	0,0951	0,0013	0,0842	0,0102
	m31.2	9153884	9202020	0,0823	0,0827	0,0825	0,0003		
	m31.3	8641082	8097293	0,0776	0,0725	0,0751	0,0035		
35	m32.1	5549967	5686933	0,0491	0,0503	0,0497	0,0009	0,0669	0,0157
	m32.2	8077913	7675655	0,0724	0,0687	0,0705	0,0026		
	m32.3	9206016	8688339	0,0828	0,0780	0,0804	0,0034		
72	m33.1	11780741	11522583	0,1065	0,1041	0,1053	0,0017	0,1020	0,0109
	m33.2	9880741	10060263	0,0890	0,0906	0,0898	0,0012		
	m33.3	12411870	12074767	0,1123	0,1092	0,1108	0,0022		
74.5	m34.1	6128416	6345696	0,0544	0,0564	0,0554	0,0014	0,0701	0,0204
	m34.2	7014913	6780139	0,0626	0,0604	0,0615	0,0015		
	m34.3	10331896	10395891	0,0931	0,0937	0,0934	0,0004		
96	m35.1	9165312	9312438	0,0824	0,0837	0,0831	0,0010	0,0627	0,0263
	m35.2	8121040	7963008	0,0728	0,0713	0,0720	0,0010		
	m35.3	3940199	3687313	0,0342	0,0319	0,0331	0,0016		
120	m36.1	7896495	7739966	0,0707	0,0693	0,0700	0,0010	0,0657	0,0086
	m36.2	6266817	6289058	0,0557	0,0559	0,0558	0,0001		
	m36.3	8091290	7832174	0,0725	0,0701	0,0713	0,0017		

Por otro lado, los resultados para PDL02-01 se muestran a continuación.

Tabla C.8: Datos de la experiencia de liberación de ampicilina desde las membranas de PDL02 y 0,1 mm de espesor. Solución usada: buffer fosfato 0,01M a pH 7 y 37°C

	Muestra	Area [mV-min]		Concentración Ampicilina [mg/ml]			Promedio	SD
		a	b	a	b	Promedio		
0	0	0	0	0,000	0,000	0,000	0	0,000
0,25	m1.1	669801	609993	0,009	0,008	0,008	0,000706	0,008
	m1.2	600298	552380	0,008	0,007	0,007	0,000566	
	m1.3	862378	801880	0,012	0,011	0,011	0,000714	0,001
0,5	m2.1	767476	752601	0,010	0,010	0,010	0,000176	0,010
	m2.2	787818	727616	0,011	0,010	0,010	0,000711	
	m2.3	754386	728041	0,010	0,010	0,010	0,000311	0,000
0,75	m3.1	699252	645161	0,009	0,008	0,009	0,000639	0,010
	m3.2	853133	805241	0,012	0,011	0,011	0,000565	
	m3.3	556599	500291	0,007	0,006	0,006	0,000665	0,002
1	m4.1	663302	600638	0,009	0,008	0,008	0,00074	0,006
	m4.2	511827	477300	0,006	0,005	0,006	0,000408	
	m4.3	489247	456745	0,006	0,005	0,005	0,000384	0,000
1,25	m5.1	549696	682633	0,007	0,009	0,008	0,001569	0,008
	m5.2	599822	760517	0,007	0,010	0,009	0,001897	
	m5.3	886513	827242	0,012	0,011	0,012	0,0007	0,001
1,5	m6.1	702538	639644	0,009	0,008	0,009	0,000743	0,007
	m6.2	532367	527349	0,006	0,006	0,006	5,92E-05	
	m6.3	471982	430401	0,005	0,005	0,005	0,000491	0,002
1,75	m7.1	592953	504595	0,007	0,006	0,007	0,001043	0,007
	m7.2	541605	524237	0,007	0,006	0,006	0,000205	
	m7.3	582474	517326	0,007	0,006	0,007	0,000769	0,000
2	m8.1	652597	621986	0,008	0,008	0,008	0,000361	0,007
	m8.2	877639	825394	0,012	0,011	0,012	0,000617	
	m8.3	506470	467146	0,006	0,005	0,006	0,000464	0,002
2,25	m9.1	795996	760401	0,011	0,010	0,010	0,00042	0,016
	m9.2	1230376	1156467	0,018	0,017	0,017	0,000873	
	m9.3	1067219	1049050	0,015	0,015	0,015	0,000215	0,002
2,5	m10.1	881239	828943	0,012	0,011	0,012	0,000617	0,010
	m10.2	732297	674308	0,010	0,009	0,009	0,000685	
	m10.3	771275	709849	0,010	0,009	0,010	0,000725	0,001
2,75	m11.1	1277842	1173747	0,019	0,017	0,018	0,001229	0,017
	m11.2	1227722	1176109	0,018	0,017	0,018	0,000609	
	m11.3	1121256	1120515	0,016	0,016	0,016	8,75E-06	0,001
3	m12.1	1439036	1410362	0,022	0,021	0,021	0,000339	0,018
	m12.2	1103740	1108866	0,016	0,016	0,016	6,05E-05	
	m12.3	1203399	1171713	0,018	0,017	0,017	0,000374	0,003
3,5	m13.1	1212020	1207274	0,018	0,018	0,018	5,6E-05	0,016
	m13.2	974426	934191	0,014	0,013	0,013	0,000475	
	m13.3	1120646	1066187	0,016	0,015	0,016	0,000643	0,002
4	m14.1	1241731	1202819	0,018	0,018	0,018	0,000459	0,012
	m14.2	869924	846053	0,012	0,012	0,012	0,000282	
	m14.3	857555	794443	0,012	0,011	0,011	0,000745	0,000
4,5	m15.1	1109236	1088660	0,016	0,016	0,016	0,000243	0,014
	m15.2	1007167	998981	0,014	0,014	0,014	9,66E-05	
	m15.3	938342	878996	0,013	0,012	0,013	0,000701	0,002
5	m16.1	783580	777464	0,011	0,010	0,011	7,22E-05	0,012
	m16.2	889429	844932	0,012	0,012	0,012	0,000525	
	m16.3	857106	916421	0,012	0,013	0,012	0,0007	0,001
5,5	m17.1	829849	818288	0,011	0,011	0,011	0,000136	0,011
	m17.2	817357	758122	0,011	0,010	0,011	0,000699	
	m17.3	608466	570383	0,008	0,007	0,007	0,00045	0,000
6	m18.1	807727	769619	0,011	0,010	0,011	0,00045	0,012
	m18.2	1033778	952147	0,015	0,013	0,014	0,000964	
	m18.3	826774	768078	0,011	0,010	0,011	0,000693	0,002
7	m19.1	750662	776940	0,010	0,010	0,010	0,00031	0,015
	m19.2	1235154	1151527	0,018	0,017	0,017	0,000987	
	m19.3	947612	875365	0,013	0,012	0,013	0,000853	0,003
8	m20.1	2626687	2528506	0,041	0,040	0,041	0,001159	0,012
	m20.2	1345560	1263577	0,020	0,019	0,019	0,000968	
	m20.3	957525	831391	0,013	0,011	0,012	0,001489	0
9	m21.1	920865	872341	0,013	0,012	0,012	0,000573	0,013
	m21.2	1436998	1425843	0,021	0,021	0,021	0,000132	
	m21.3	1028774	859069	0,015	0,012	0,013	0,002004	0,001
10	m22.1	1165782	1764538	0,017	0,027	0,022	0,007069	0,019
	m22.2	1146240	1167277	0,017	0,017	0,017	0,000248	
	m22.3	1363641	1165394	0,020	0,017	0,019	0,002341	0,003
11	m23.1	728640	753069	0,010	0,010	0,010	0,000288	0,018
	m23.2	1163775	1161992	0,017	0,017	0,017	2,11E-05	
	m23.3	1339774	1288739	0,020	0,019	0,019	0,000603	0,002
12	m24.1	1830909	1693778	0,028	0,026	0,027	0,001619	0,015
	m24.2	1079892	1103483	0,016	0,016	0,016	0,000279	
	m24.3	1019142	939315	0,014	0,013	0,014	0,000942	0,001
15	m25.1	1147287	1124788	0,017	0,016	0,016	0,000266	0,014
	m25.2	981334	1046887	0,014	0,015	0,014	0,000774	
	m25.3	891458	851503	0,012	0,012	0,012	0,000472	0,002
18	m26.1	824261	727689	0,011	0,010	0,010	0,00114	0,016
	m26.2	1193579	1183430	0,017	0,017	0,017	0,00012	
	m26.3	1099965	1043221	0,016	0,015	0,015	0,00067	0,001
21	m27.1	1533221	1469565	0,023	0,022	0,023	0,000752	0,021
	m27.2	1476434	1501459	0,022	0,023	0,022	0,000295	
	m27.3	1295277	1172333	0,019	0,017	0,018	0,001451	0,003
30	m28.1	1178749	1122511	0,017	0,016	0,017	0,000664	0,018

	Muestra	Área [mV·min]		Concentración Ampicilina [mg/ml]				Promedio	SD
		a	b	a	b	Promedio	SD		
	m28.2	1396287	1281464	0,021	0,019	0,020	0,001356		
	m28.3	1300006	1187446	0,019	0,017	0,018	0,001329		
23	m29.1	1654808	1639319	0,025	0,025	0,025	0,000183	0,016	0,001
	m29.2	1147295	1203802	0,017	0,018	0,017	0,000667		
	m29.3	1034502	1076290	0,015	0,015	0,015	0,000493		
42	m30.1	1845949	1998041	0,028	0,031	0,030	0,001796	0,028	0,002
	m30.2	1767564	1707912	0,027	0,026	0,026	0,000704		
	m30.3	1917178	1900989	0,029	0,029	0,029	0,000191		
48	m31.1	1781737	1823482	0,027	0,028	0,028	0,000493	0,025	0,003
	m31.2	1494368	1485796	0,022	0,022	0,022	0,000101		
	m31.3	1666677	1707808	0,025	0,026	0,026	0,000486		
35	m32.1	1750148	1686613	0,027	0,026	0,026	0,00075	0,023	0,004
	m32.2	1640230	1579334	0,025	0,024	0,024	0,000719		
	m32.3	1373405	1252768	0,020	0,018	0,019	0,001424		
72	m33.1	2313153	2310630	0,036	0,036	0,036	2,98E-05	0,033	0,003
	m33.2	1955798	1934046	0,030	0,030	0,030	0,000257		
	m33.3	2148377	2274911	0,033	0,035	0,034	0,001494		
74.5	m34.1	2049458	2196838	0,032	0,034	0,033	0,00174	0,030	0,004
	m34.2	1954814	2107725	0,030	0,033	0,031	0,001805		
	m34.3	1674752	1601776	0,025	0,024	0,025	0,000862		
96	m35.1	2507090	2346530	0,039	0,037	0,038	0,001896	0,037	0,001
	m35.2	2372665	2317435	0,037	0,036	0,037	0,000652		
	m35.3	1531714	1437320	0,023	0,021	0,022	0,001114		
120	m36.1	2115270	2064417	0,033	0,032	0,032	0,0006	0,030	0,003
	m36.2	2304902	1750436	0,036	0,027	0,031	0,006546		
	m36.3	1551719	2045201	0,023	0,032	0,028	0,005826		
144	m37.1	2637863	2061350	0,042	0,032	0,037	0,006806	0,023	0,003
	m37.2	1684382	1584741	0,026	0,024	0,025	0,001176		
	m37.3	1435771	1371358	0,021	0,020	0,021	0,00076		

Finalmente, los resultados para PDL02-033 son los siguientes.

Tabla C.10: Datos de la experiencia de liberación de ampicilina desde las membranas de PDL02 y 0,33 mm de espesor. Solución usada: buffer fosfato 0,01M a pH 7 y 37°C

	Muestra	Área [mV·min]		Concentración Ampicilina [mg/ml]				Promedio	SD
		a	b	a	b	Promedio	SD		
0	0	0	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,25	m1.1	521178	481032	0,0027	0,0023	0,0025	0,0003	0,0025	0,0010
	m1.2	319643	446755	0,0008	0,0020	0,0014	0,0008		
	m1.3	611141	588627	0,0035	0,0033	0,0034	0,0001		
0,5	m2.1	338167	500605	0,0010	0,0025	0,0018	0,0011	0,0018	0,0011
	m2.2	330123	291857	0,0009	0,0006	0,0008	0,0002		
	m2.3	527046	550575	0,0028	0,0030	0,0029	0,0002		
0,75	m3.1	406623	419149	0,0016	0,0018	0,0017	0,0001	0,0019	0,0007
	m3.2	580077	445682	0,0032	0,0020	0,0026	0,0009		
	m3.3	356854	374290	0,0012	0,0013	0,0013	0,0001		
1	m4.1	382790	367763	0,0014	0,0013	0,0014	0,0001	0,0018	0,0004
	m4.2	477467	412766	0,0023	0,0017	0,0020	0,0004		
	m4.3	516458	377580	0,0027	0,0014	0,0020	0,0009		
1,25	m5.1	382374	427830	0,0014	0,0018	0,0016	0,0003	0,0017	0,0004
	m5.2	370902	401547	0,0013	0,0016	0,0015	0,0002		
	m5.3	466305	453466	0,0022	0,0021	0,0021	0,0001		
1,5	m6.1	366463	395545	0,0013	0,0015	0,0014	0,0002	0,0011	0,0005
	m6.2	265632	318118	0,0003	0,0008	0,0006	0,0003		
	m6.3	380998	387965	0,0014	0,0015	0,0014	0,0000		
1,75	m7.1	699311	794417	0,0043	0,0052	0,0048	0,0006	0,0040	0,0010
	m7.2	676975	729126	0,0041	0,0046	0,0044	0,0003		
	m7.3	464807	613502	0,0022	0,0035	0,0029	0,0010		
2	m8.1	497836	509038	0,0025	0,0026	0,0025	0,0001	0,0020	0,0006
	m8.2	420675	467754	0,0018	0,0022	0,0020	0,0003		
	m8.3	386301	370190	0,0015	0,0013	0,0014	0,0001		
2,25	m9.1	348031	370721	0,0011	0,0013	0,0012	0,0001	0,0024	0,0015
	m9.2	554468	786937	0,0030	0,0051	0,0041	0,0015		
	m9.3	438101	436424	0,0019	0,0019	0,0019	0,0000		
2,5	m10.1	475931	553946	0,0023	0,0030	0,0026	0,0005	0,0025	0,0008
	m10.2	403277	420693	0,0016	0,0018	0,0017	0,0001		
	m10.3	549221	618072	0,0030	0,0036	0,0033	0,0004		
2,75	m11.1	366893	438654	0,0013	0,0019	0,0016	0,0005	0,0027	0,0014
	m11.2	766980	631559	0,0050	0,0037	0,0043	0,0009		
	m11.3	465593	477862	0,0022	0,0023	0,0022	0,0001		
3	m12.1	635689	571315	0,0038	0,0032	0,0035	0,0004	0,0030	0,0004
	m12.2	502778	529301	0,0025	0,0028	0,0027	0,0002		
	m12.3	493476	574782	0,0024	0,0032	0,0028	0,0005		
3,5	m13.1	469972	616027	0,0022	0,0036	0,0029	0,0010	0,0056	0,0023
	m13.2	943240	975484	0,0066	0,0069	0,0067	0,0002		
	m13.3	1012395	970984	0,0072	0,0068	0,0070	0,0003		
4	m14.1	528059	599122	0,0028	0,0034	0,0031	0,0005	0,0029	0,0006
	m14.2	598330	597044	0,0034	0,0034	0,0034	0,0000		
	m14.3	462790	474248	0,0022	0,0023	0,0022	0,0001		

	Muestra	Área [mV·min]		Concentración Ampicilina [mg/ml]				Promedio	SD
		a	b	a	b	Promedio	SD		
4,5	m15.1	951042	1322789	0,0067	0,0101	0,0084	0,0024	0,0045	0,0034
	m15.2	582252	568529	0,0033	0,0031	0,0032	0,0001		
	m15.3	588932	904384	-0,0021	0,0062	0,0021	0,0059		
5	m16.1	454760	437156	0,0021	0,0019	0,0020	0,0001	0,0023	0,0004
	m16.2	431194	481299	0,0019	0,0023	0,0021	0,0003		
	m16.3	481299	555173	0,0023	0,0030	0,0027	0,0005		
5,5	m17.1	847597	629557	0,0057	0,0037	0,0047	0,0014	0,0036	0,0010
	m17.2	588699	586129	0,0033	0,0033	0,0033	0,0000		
	m17.3	513775	519641	0,0026	0,0027	0,0027	0,0000		
6	m18.1	542546	558422	0,0029	0,0030	0,0030	0,0001	0,0044	0,0018
	m18.2	546395	750433	0,0029	0,0048	0,0039	0,0013		
	m18.3	926745	918822	0,0064	0,0064	0,0064	0,0001		
7	m19.1	678888	763911	0,0042	0,0049	0,0045	0,0006	0,0041	0,0004
	m19.2	682869	612350	0,0042	0,0035	0,0039	0,0005		
	m19.3	753452	572940	0,0048	0,0032	0,0040	0,0012		
8	m20.1	844464	830435	0,0057	0,0055	0,0056	0,0001	0,0043	0,0013
	m20.2	671238	691020	0,0041	0,0043	0,0042	0,0001		
	m20.3	533603	584880	0,0028	0,0033	0,0030	0,0003		
9	m21.1	659963	683300	0,0040	0,0042	0,0041	0,0002	0,0073	0,0041
	m21.2	721823	987918	0,0045	0,0070	0,0058	0,0017		
	m21.3	1316055	1729295	0,0100	0,0138	0,0119	0,0027		
10	m22.1	995324	1011988	0,0071	0,0072	0,0071	0,0001	0,0068	0,0008
	m22.2	844272	883884	0,0057	0,0060	0,0059	0,0003		
	m22.3	1177317	876653	0,0087	0,0060	0,0074	0,0020		
11	m23.1	655404	662248	0,0039	0,0040	0,0040	0,0000	0,0041	0,0007
	m23.2	583203	620586	0,0033	0,0036	0,0034	0,0002		
	m23.3	759995	737432	0,0049	0,0047	0,0048	0,0001		
12	m24.1	740791	653989	0,0047	0,0039	0,0043	0,0006	0,0069	0,0024
	m24.2	932550	1083311	0,0065	0,0079	0,0072	0,0010		
	m24.3	1278053	1166084	0,0097	0,0086	0,0092	0,0007		
15	m25.1	1493144	1542147	0,0117	0,0121	0,0119	0,0003	0,0109	0,0056
	m25.2	715855	795786	0,0045	0,0052	0,0049	0,0005		
	m25.3	2977695	913946	0,0253	0,0063	0,0158	0,0135		
18	m26.1	859482	1194676	0,0058	0,0089	0,0074	0,0022	0,0075	0,0019
	m26.2	833479	861767	0,0056	0,0058	0,0057	0,0002		
	m26.3	1364486	1155957	0,0105	0,0086	0,0095	0,0014		
21	m27.1	616690	613284	0,0036	0,0035	0,0036	0,0000	0,0044	0,0007
	m27.2	716112	748355	0,0045	0,0048	0,0046	0,0002		
	m27.3	710872	819547	0,0044	0,0054	0,0049	0,0007		
30	m28.1	2523482	1990616	0,0212	0,0162	0,0187	0,0035	0,0116	0,0064
	m28.2	951690	844486	0,0067	0,0057	0,0062	0,0007		
	m28.3	1456143	1124872	0,0113	0,0083	0,0098	0,0022		
23	m29.1	875304	964156	0,0060	0,0068	0,0064	0,0006	0,0068	0,0005
	m29.2	873687	1158602	0,0059	0,0086	0,0073	0,0019		
	m29.3	992366	903406	0,0070	0,0062	0,0066	0,0006		
42	m30.1	2813993	3010413	0,0238	0,0256	0,0247	0,0013	0,0216	0,0066
	m30.2	3456445	2665280	0,0298	0,0225	0,0261	0,0052		
	m30.3	1756000	1742364	0,0141	0,0140	0,0140	0,0001		
48	m31.1	3096477	3379083	0,0264	0,0290	0,0277	0,0018	0,0162	0,0100
	m31.2	1258757	1445339	0,0095	0,0112	0,0104	0,0012		
	m31.3	1102431	1607160	0,0081	0,0127	0,0104	0,0033		
35	m32.1	1403844	1814061	0,0108	0,0146	0,0127	0,0027	0,0113	0,0014
	m32.2	1360183	1525787	0,0104	0,0120	0,0112	0,0011		
	m32.3	1081413	1547039	0,0079	0,0122	0,0100	0,0030		
72	m33.1	1524247	1414738	0,0119	0,0109	0,0114	0,0007	0,0123	0,0041
	m33.2	1342084	2737953	0,0103	0,0231	0,0167	0,0091		
	m33.3	1256078	1091884	0,0095	0,0080	0,0087	0,0011		
74.5	m34.1	2081629	2119690	0,0171	0,0174	0,0173	0,0002	0,0143	0,0029
	m34.2	1516517	1419633	0,0119	0,0110	0,0114	0,0006		
	m34.3	1827779	1702960	0,0147	0,0136	0,0142	0,0008		
96	m35.1	6492466	4681742	0,0578	0,0411	0,0494	0,0118	0,0298	0,0219
	m35.2	4681742	3107215	0,0411	0,0265	0,0338	0,0103		
	m35.3	931070	853525	0,0065	0,0058	0,0061	0,0005		
120	m36.1	1935586	1887023	0,0157	0,0153	0,0155	0,0003	0,0207	0,0123
	m36.2	4054586	3926985	0,0353	0,0341	0,0347	0,0008		
	m36.3	1380662	1626841	0,0106	0,0129	0,0118	0,0016		
144	m37.1	2963691	2837967	0,0252	0,0241	0,0246	0,0008	0,0275	0,0175
	m37.2	1390994	1605938	0,0107	0,0127	0,0117	0,0014		
	m37.3	5548385	4949443	0,0490	0,0435	0,0463	0,0039		

En todos los casos, los datos que no aparecen se debe a que las muestras se perdieron durante el proceso de medición.

## Anexo D

# Determinación de la distribución de la concentración de ampicilina en la matriz polimérica

Como se explicó en la Sección 4, se espera que la concentración al interior de la membrana no sea homogénea y que ésta sea mayor en las proximidades de la superficie de la membrana. Por esto se decidió representar esta distribución de concentración como un escalon que represente una alta concentración de ampicilina en las proximidades de la superficie de la membrana y cero hacia el interior, como lo representa la Ecuación 4.10.

La determinación del valor de  $e_i$  se hizo considerando que la integral de esta función en el espesor de la membrana debería ser igual a la integral de la concentración homogénea de la membrana, que es constante y conocida ( $C_i = 337,08 [mol/m^3]$ ). En otras palabras, se tiene que:

$$\int_{e/2}^y 2500 dx = \int_0^{e/2} C_i dx \quad (D.1)$$

Esta ecuación es igual a:

$$2500 * (y - e/2) = 168.54 * e \quad (D.2)$$

Por lo que el valor de  $y$  dependerá del espesor de membrana, como indica la siguiente tabla:

<b>Espesor [cm]</b>	<b>y</b>
0,005	0,00283708
0,01	0,00567416
0,033	0,0187247

# Anexo E

## Reporte de COMSOL del modelo



1D-V3

---

**Date**

**Jan 4, 2015 4:43:31 PM**

## Contents

1. Global.....	3
1.1. Definitions .....	3
2. mb005.....	8
2.1. Definitions .....	8
2.2. Geometry 1.....	10
2.3. Transport of Diluted Species.....	10
2.4. Mesh 1.....	11
3. mb01.....	12
3.1. Definitions .....	12
3.2. Geometry 2.....	12
3.3. Transport of Diluted Species 2.....	13
3.4. Mesh 2.....	14
4. mb033.....	15
4.1. Definitions .....	15
4.2. Geometry 3.....	15
4.3. Transport of Diluted Species 3.....	16
4.4. Mesh 3.....	17
5. Study 1 .....	18
5.1. Time Dependent .....	18
6. Results.....	19
6.1. Data Sets.....	19
6.2. Derived Values.....	36
6.3. Tables .....	37
6.4. Plot Groups.....	39

# 1 Global

## Used products

COMSOL Multiphysics
Batteries & Fuel Cells Module

## 1.1 Definitions

### 1.1.1 Parameters 1

#### Parameters

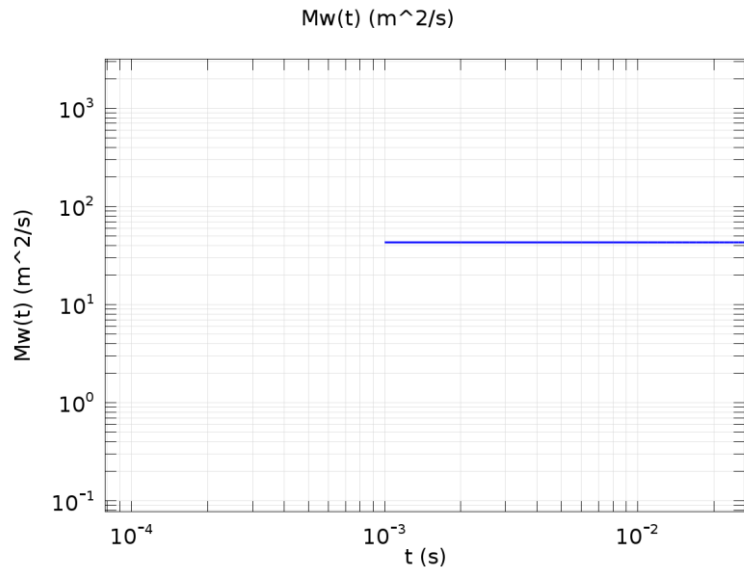
Name	Expression	Value	Description
Dw	$2.9e-3[m^2/s]$	0.0029000 m <sup>2</sup> /s	Difusividad en agua
Dp	$60e-19[m^2/s]$	6.0000E-18 m <sup>2</sup> /s	Difusividad en polimero (iv=0.4)
e	0.005[cm]	5.0000E-5 m	Espesor
A	1[cm <sup>2</sup> ]	1.0000E-4 m <sup>2</sup>	Area de transferencia
PM	403.46[g/mol]	0.40346 kg/mol	peso molecular amp
V1	A*e	5.0000E-9 m <sup>3</sup>	Vol mb
M1	0.00068[g]	6.8000E-7 kg	Carga inicial
C1	$M1/(PM*V1)$	337.08 mol/m <sup>3</sup>	Concentracion inicial
K	$2.3*4.4e-3[h^{-1}]$	2.8111E-6 1/s	velocidad de degradacion amp
Mw0	43000[g/mol]	43.000 kg/mol	Peso molec promedio pla
Mw01	17000[g/mol]	17.000 kg/mol	
Cmax	991[mol/m <sup>3</sup> ]	991.00 mol/m <sup>3</sup>	Conc max en membrana
Cmin	10[mol/m <sup>3</sup> ]	10.000 mol/m <sup>3</sup>	Conc min en membrana
c	1e-16	1.0000E-16	Cte de fun Degra2
k	$2*0.104[d^{-1}]$	2.4074E-6 1/s	veloc degradacion polimero
e2	0.1[mm]	1.0000E-4 m	espesor de mb 2
e3	0.33[mm]	3.3000E-4 m	espesor de mb 3
K1	0[h <sup>-1</sup> ]	0.0000 1/s	

### 1.1.2 Functions

#### Mw

Function name	Mw
Function type	Analytic

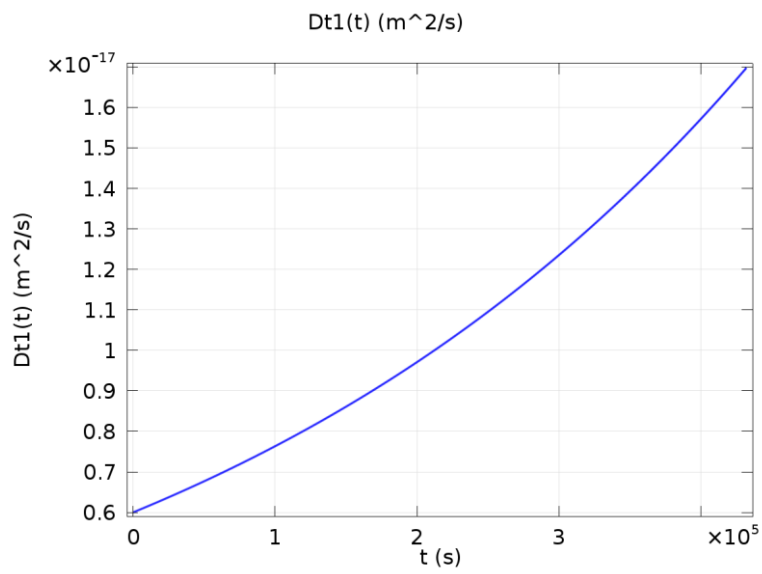




Mw

**Degra1**

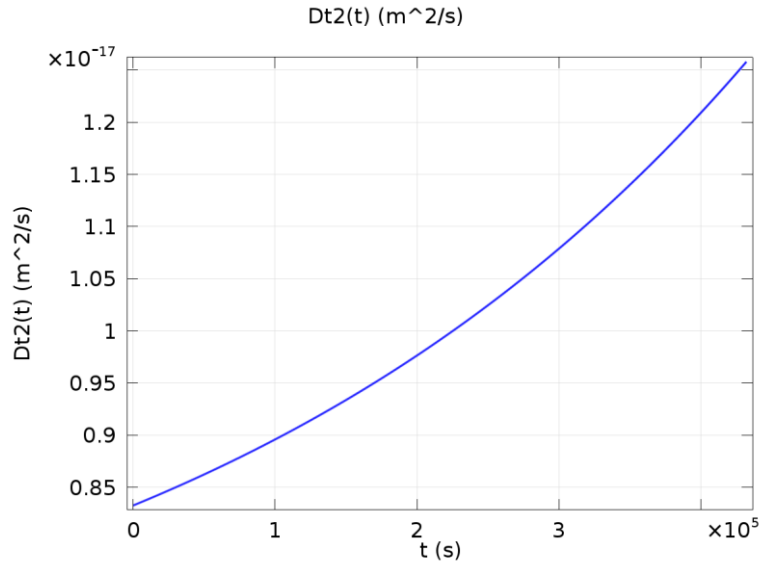
Function name	Dt1
Function type	Analytic



Degra1

**Degra2**

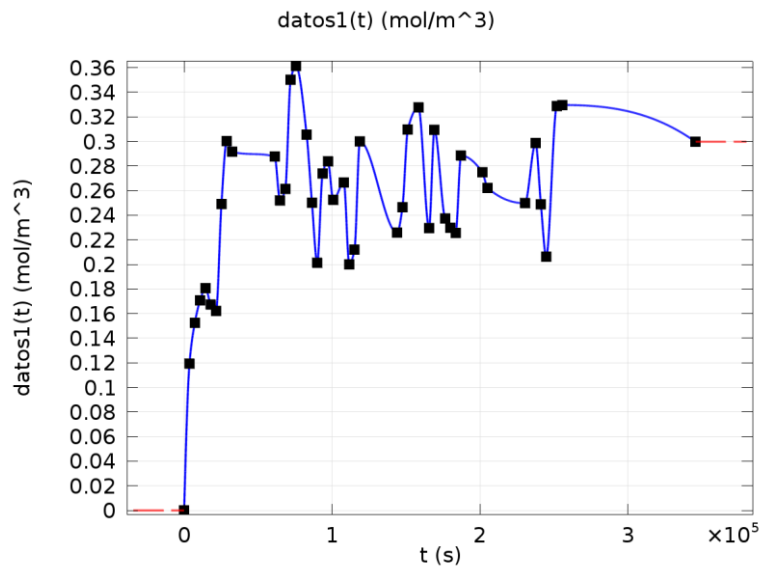
Function name	Dt2
Function type	Analytic



*Degra2*

*pdl04005*

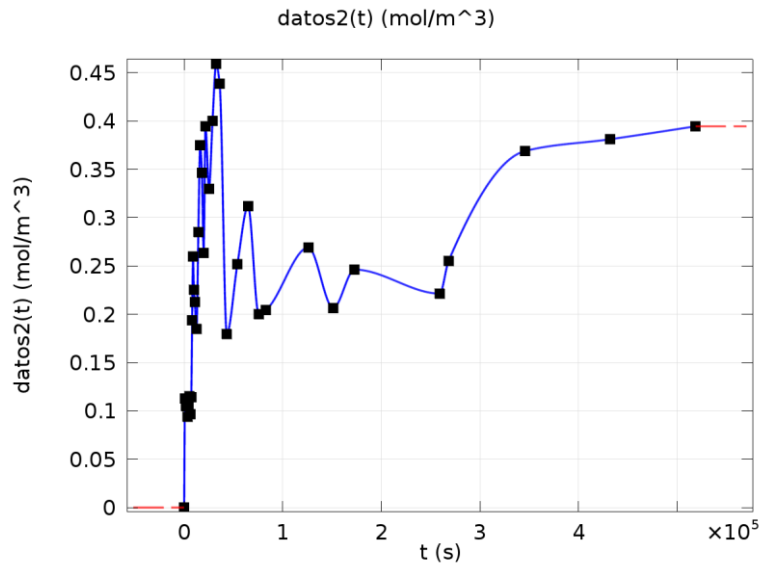
Function name	datos1
Function type	Interpolation



*pdl04005*

*pdl0401*

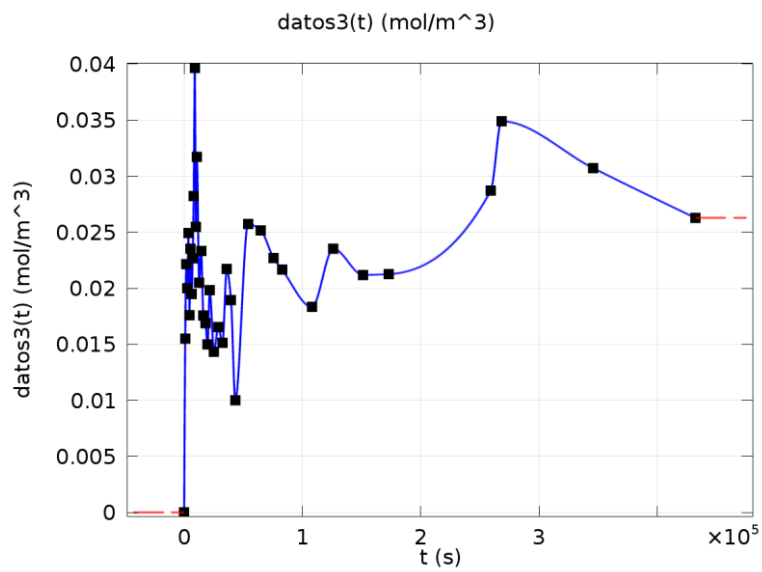
Function name	datos2
Function type	Interpolation



*pdI0401*

***pdI04033***

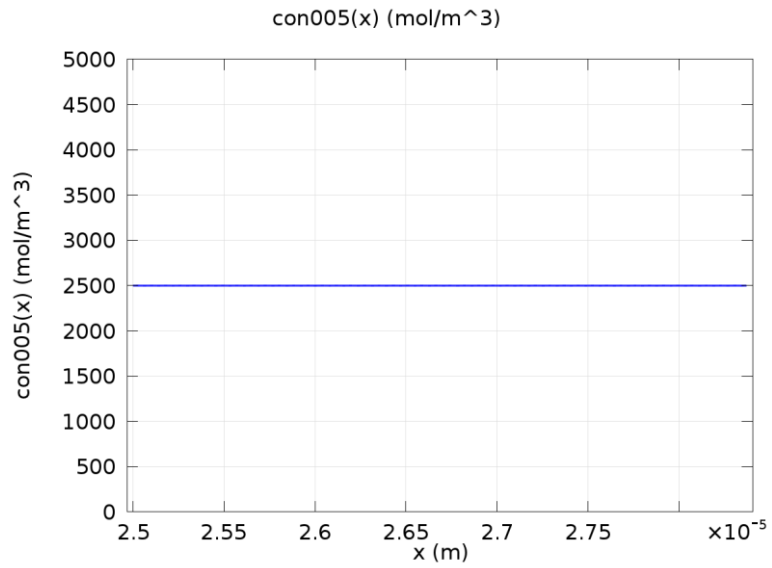
Function name	datos3
Function type	Interpolation



*pdI04033*

***concentracion005***

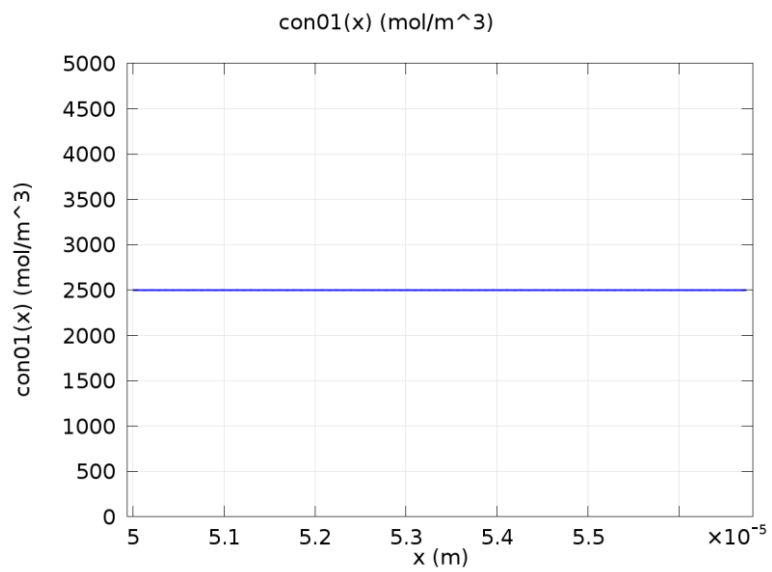
Function name	con005
Function type	Analytic



*concentracion005*

***concentracion01***

Function name	con01
Function type	Analytic



*concentracion01*

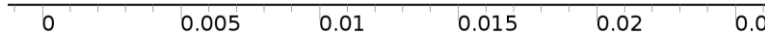
## 2 mb005

### 2.1 Definitions

#### 2.1.1 Probes

##### *PLA Probe 1*

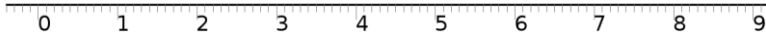
Probe type	Domain probe
------------	--------------



*Selection*

##### *Medio Probe 2*

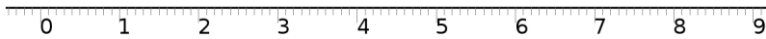
Probe type	Domain probe
------------	--------------



*Selection*

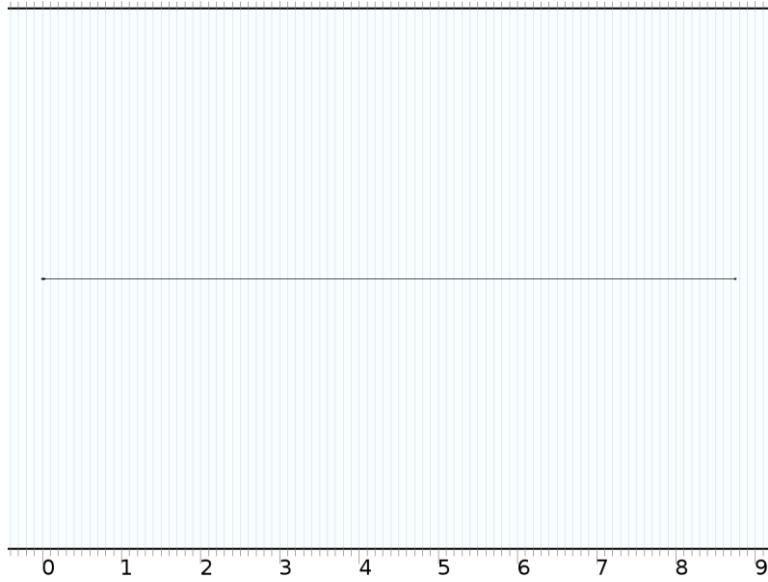
***Total Probe 3***

Probe type	Domain probe
------------	--------------



*Selection*

## 2.2 Geometry 1

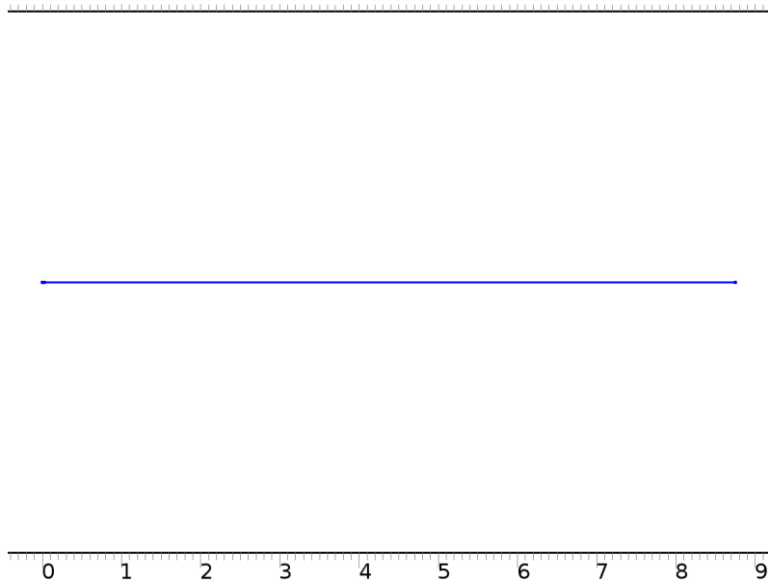


*Geometry 1*

### Units

Length unit	mm
Angular unit	deg

## 2.3 Transport of Diluted Species



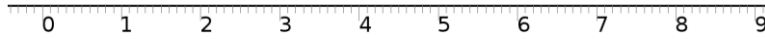
*Transport of Diluted Species*

### Features

Transport Properties 1
------------------------

No Flux 1
Initial Values 1
Transport Properties 2
Initial Values 2
Symmetry 1
Reactions 1

## 2.4 Mesh 1



*Mesh 1*



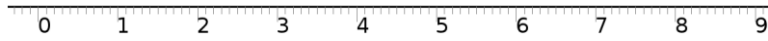
### 3 mb01

#### 3.1 Definitions

##### 3.1.1 Probes

###### *Domain Probe 4*

Probe type	Domain probe
------------	--------------



*Selection*

#### 3.2 Geometry 2



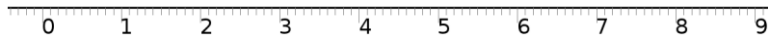
*Geometry 2*

### Units

Length unit	mm
Angular unit	deg

## 3.3 Transport of Diluted Species 2

---

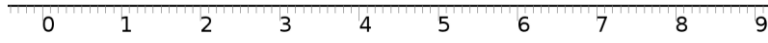
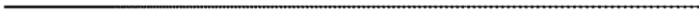


*Transport of Diluted Species 2*

### Features

Transport Properties 1
No Flux 1
Initial Values 1
Transport Properties 2
Reactions 1
Initial Values 2
Symmetry 1

### 3.4 Mesh 2



*Mesh 2*

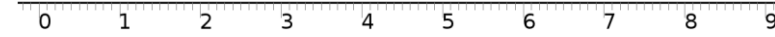
## 4 mb033

### 4.1 Definitions

#### 4.1.1 Probes

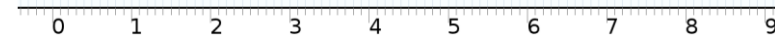
##### *Domain Probe 5*

Probe type	Domain probe
------------	--------------



*Selection*

### 4.2 Geometry 3



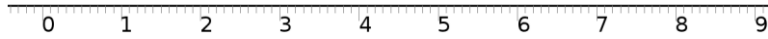
*Geometry 3*

### Units

Length unit	mm
Angular unit	deg

## 4.3 Transport of Diluted Species 3

---

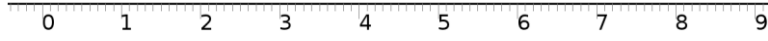


*Transport of Diluted Species 3*

### Features

Transport Properties 1
No Flux 1
Initial Values 1
Transport Properties 2
Symmetry 1
Initial Values 2
Reactions 1

## 4.4 Mesh 3



*Mesh 3*

## 5 Study 1

### 5.1 Time Dependent

#### Study settings

Property	Value
Include geometric nonlinearity	Off

Times	Unit
$\sqrt{\text{range}(0,0.1,100)}$ , range(11,1,120)	h

#### Physics and variables selection

Physics interface	Discretization
Transport of Diluted Species (tds)	physics
Transport of Diluted Species 2 (tds2)	physics
Transport of Diluted Species 3 (tds3)	physics

#### Mesh selection

Geometry	Mesh
Geometry 1 (geom1)	mesh1
Geometry 2 (geom2)	mesh2
Geometry 3 (geom3)	mesh3

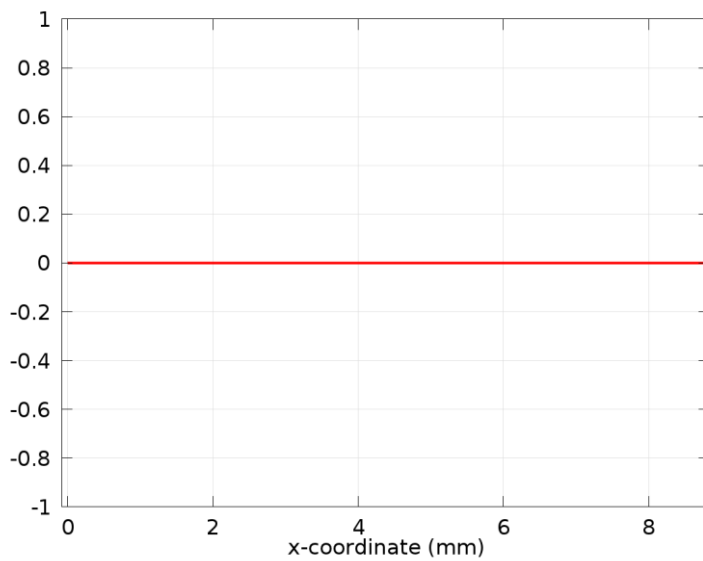
## 6 Results

### 6.1 Data Sets

#### 6.1.1 Study 1/Solution 1 (1)

##### Solution

Name	Value
Solution	Solution 1
Component	Save Point Geometry 1



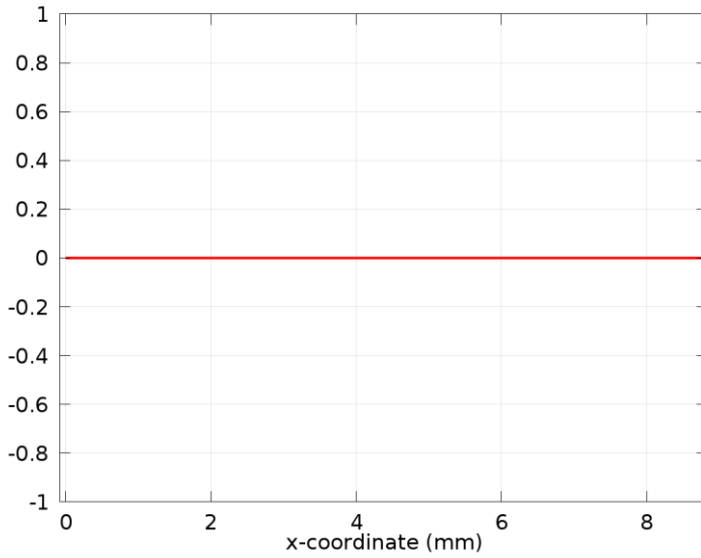
*Data set: Study 1/Solution 1 (1)*

#### 6.1.2 Study 1/Solution 1 (2)

##### Solution

Name	Value
Solution	Solution 1
Component	Save Point Geometry 2



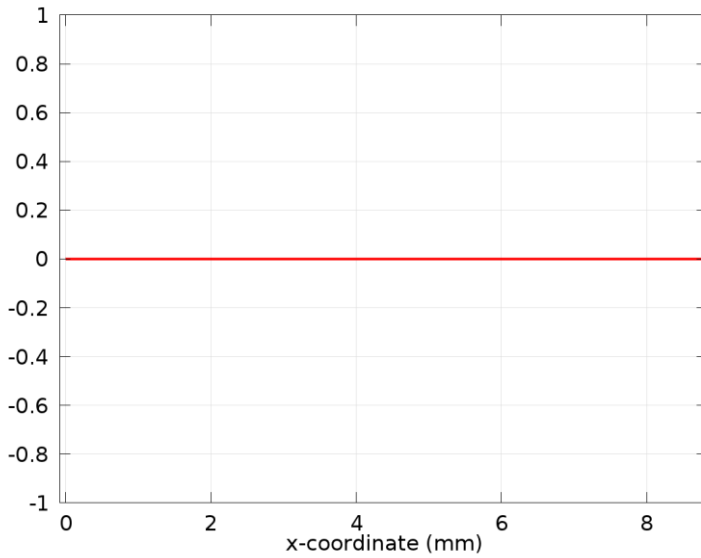


Data set: Study 1/Solution 1 (2)

### 6.1.3 Study 1/Solution 1 (3)

Solution

Name	Value
Solution	Solution 1
Component	Save Point Geometry 3

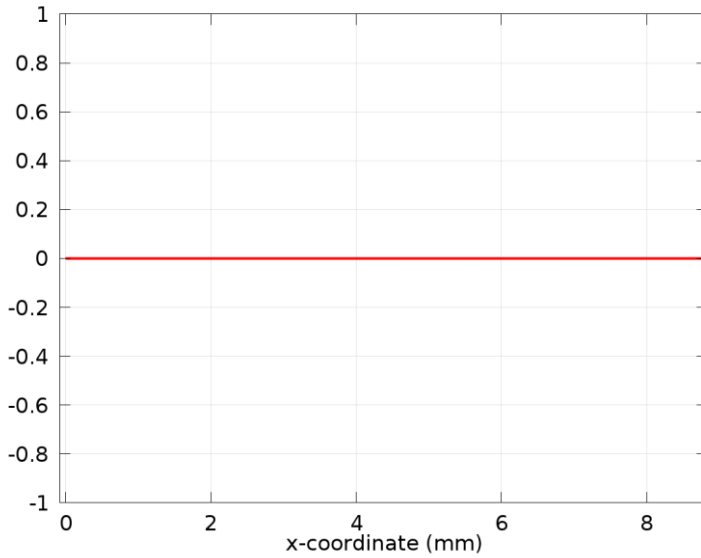


Data set: Study 1/Solution 1 (3)

### 6.1.4 Probe Solution 4

Solution

Name	Value
Solution	Solution 1
Component	Save Point Geometry 1
Frame	Geometry (x, y, z)



*Data set: Probe Solution 4*

### 6.1.5 PLA Probe 1

#### Selection

Geometric entity level	Domain
Selection	Domain 1

#### Data

Name	Value
Data set	Probe Solution 4

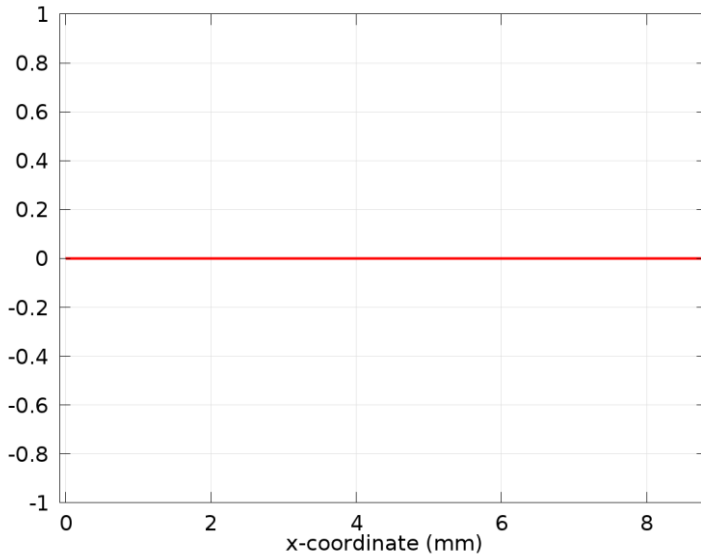
#### Settings

Name	Value
Method	Integration
Integration order	4
Integration order	On

### 6.1.6 Probe Solution 5

#### Solution

Name	Value
Solution	Solution 1
Component	Save Point Geometry 1
Frame	Spatial (x, y, z)



*Data set: Probe Solution 5*

### 6.1.7 Medio Probe 2

#### Selection

Geometric entity level	Domain
Selection	Domain 2

#### Data

Name	Value
Data set	Probe Solution 5

#### Settings

Name	Value
Method	Integration
Integration order	4
Integration order	On

### 6.1.8 Total Probe 3

#### Selection

Geometric entity level	Domain
Selection	Domains 1–2

#### Data

Name	Value
Data set	Probe Solution 4

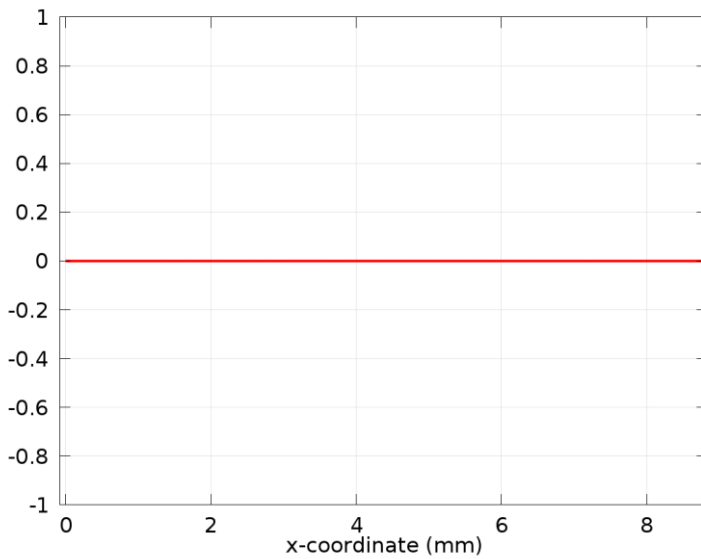
#### Settings

Name	Value
Method	Integration
Integration order	4
Integration order	On

### 6.1.9 Probe Solution 6

#### Solution

Name	Value
Solution	Solution 1
Component	Save Point Geometry 2



*Data set: Probe Solution 6*

### 6.1.10 Domain Probe 4

#### Selection

Geometric entity level	Domain
------------------------	--------

Selection	Domain 2
-----------	----------

**Data**

Name	Value
Data set	Probe Solution 6

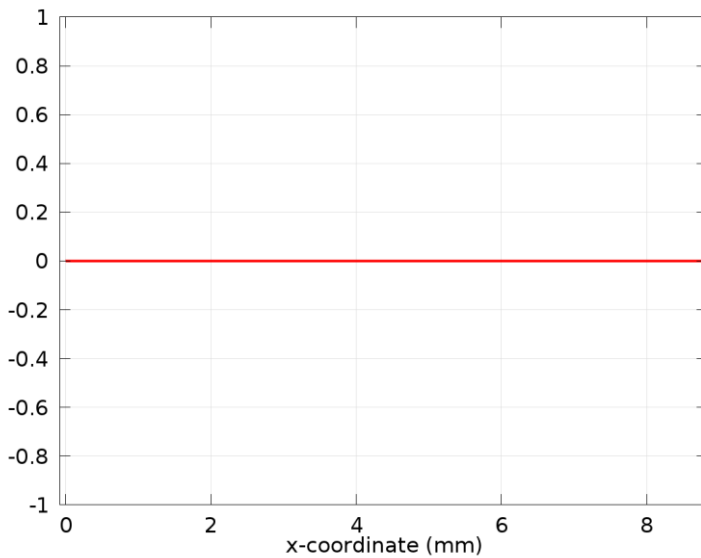
**Settings**

Name	Value
Method	Integration
Integration order	4
Integration order	On

**6.1.11 Probe Solution 7**

**Solution**

Name	Value
Solution	Solution 1
Component	Save Point Geometry 3



*Data set: Probe Solution 7*

**6.1.12 Domain Probe 5**

**Selection**

Geometric entity level	Domain
Selection	Domain 2

### Data

Name	Value
Data set	Probe Solution 7

### Settings

Name	Value
Method	Integration
Integration order	4
Integration order	On

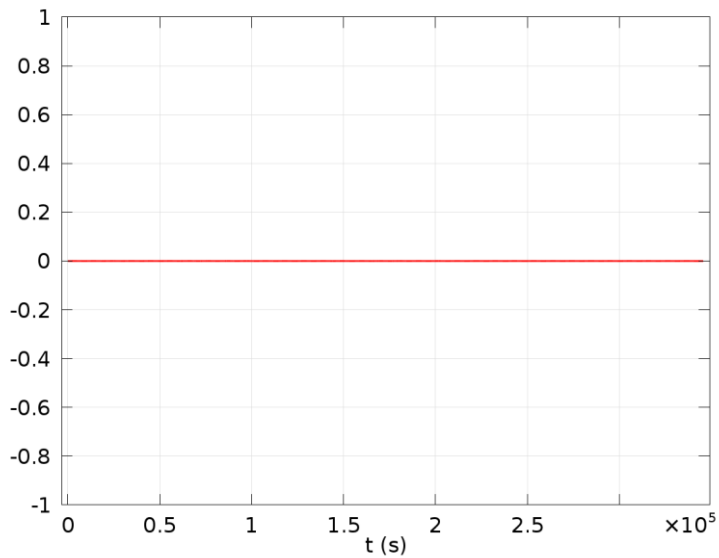
### 6.1.13 Function 1D 1

#### Function

Name	Value
Function	pdl04005

#### Parameter bounds

Name	Value
Name	t
Minimum	0
Maximum	345600



Data set: Function 1D 1

### 6.1.14 Cut Point 1D 1

#### Data

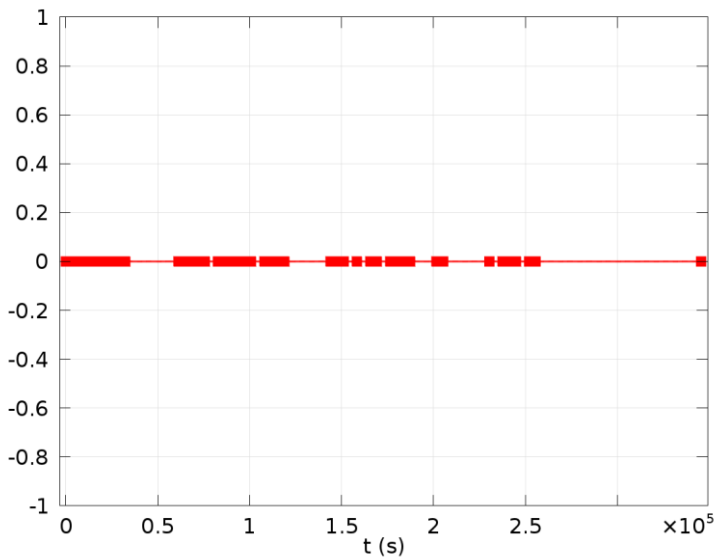
Name	Value
Data set	Function 1D 1

**Point data**

Name	Value
Entry method	Coordinates

**Settings**

Name	Value
t	{0, 3600, 7200, 10800, 14400, 18000, 21600, 25200, 28800, 32400, 61200, 64800, 68400, 72000, 75600, 82800, 86400, 90000, 93600, 97200, 100800, 108000, 111600, 115200, 118800, 144000, 147600, 151200, 158400, 165600, 169200, 176400, 180000, 183600, 187200, 201600, 205200, 230400, 237600, 241200, 244800, 252000, 255600, 345600}



Data set: Cut Point 1D 1

**6.1.15 Function 1D 2**

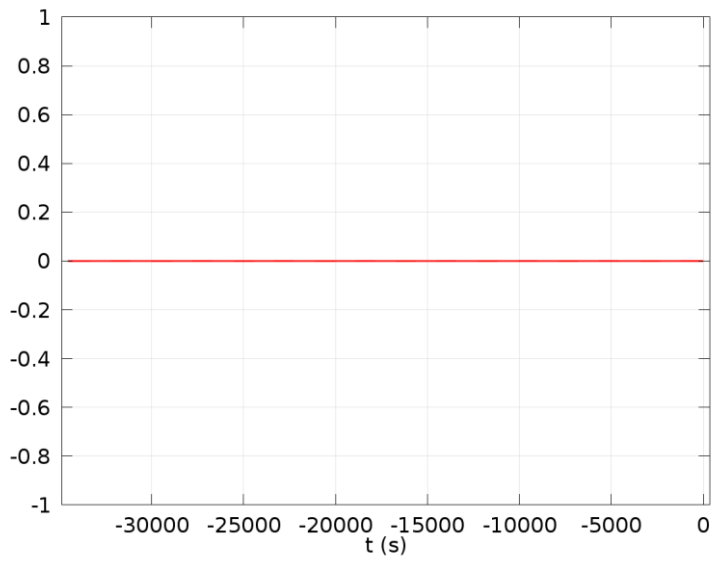
**Function**

Name	Value
Function	pdl04005

**Parameter bounds**

Name	Value
Name	t
Minimum	-34560

Name	Value
Maximum	0



Data set: Function 1D 2

### 6.1.16 Function 1D 3

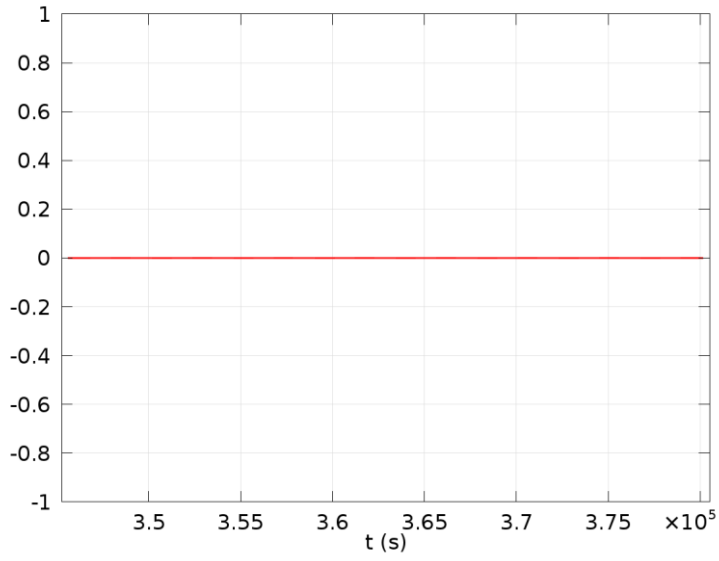
#### Function

Name	Value
Function	pdl04005

#### Parameter bounds

Name	Value
Name	t
Minimum	345600
Maximum	380160





Data set: Function 1D 3

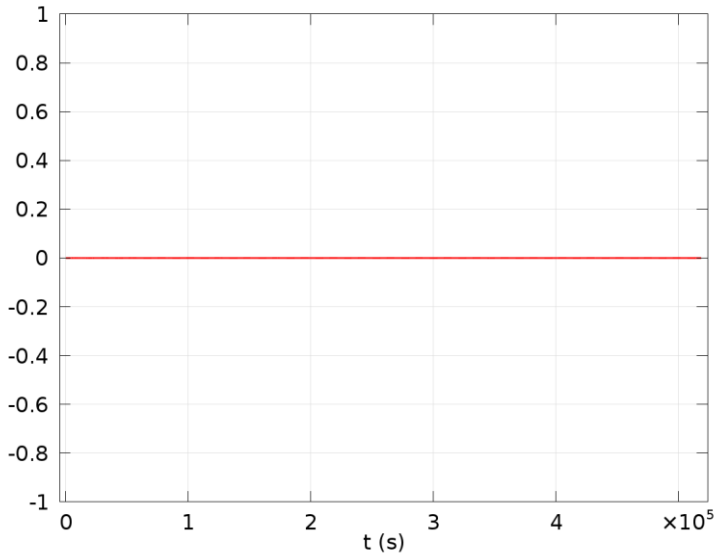
### 6.1.17 Function 1D 1a

#### Function

Name	Value
Function	pdl0401

#### Parameter bounds

Name	Value
Name	t
Minimum	0
Maximum	518400



Data set: Function 1D 1a

### 6.1.18 Cut Point 1D 2

#### Data

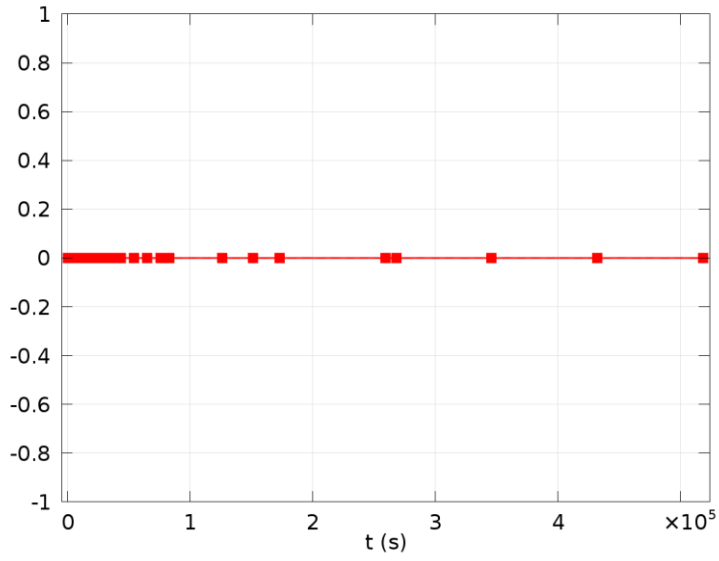
Name	Value
Data set	Function 1D 1a

#### Point data

Name	Value
Entry method	Coordinates

#### Settings

Name	Value
t	{0, 900, 1800, 2700, 3600, 4500, 5400, 6300, 7200, 8100, 9000, 9900, 10800, 12600, 14400, 16200, 18000, 19800, 21600, 25200, 28800, 32400, 36000, 43200, 54000, 64800, 75600, 82800, 151200, 172800, 126000, 259200, 268200, 345600, 432000, 518400}



Data set: Cut Point 1D 2

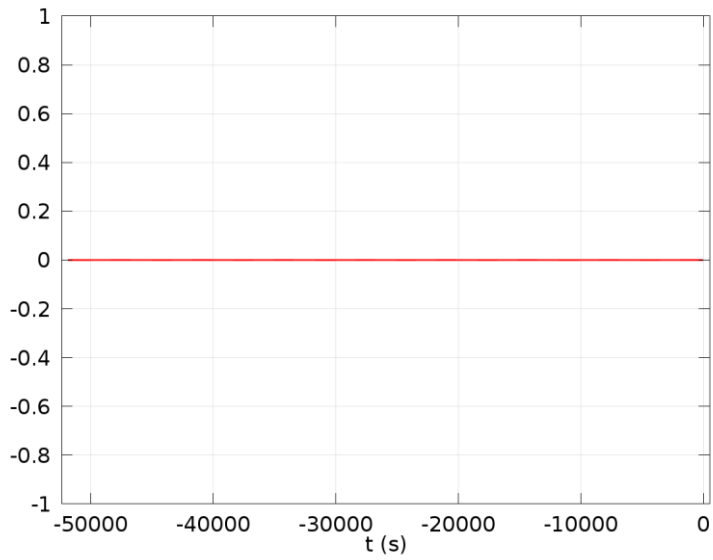
### 6.1.19 Function 1D 2a

#### Function

Name	Value
Function	pdl0401

#### Parameter bounds

Name	Value
Name	t
Minimum	-51840
Maximum	0



Data set: Function 1D 2a

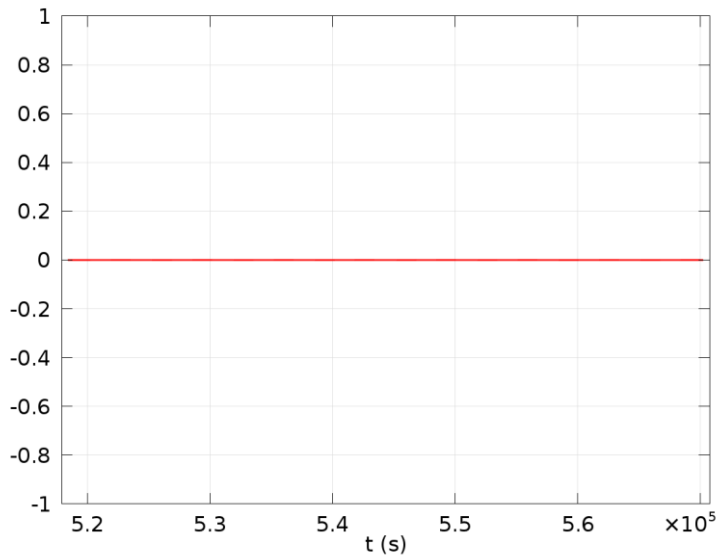
### 6.1.20 Function 1D 3a

#### Function

Name	Value
Function	pdl0401

#### Parameter bounds

Name	Value
Name	t
Minimum	518400
Maximum	570240



Data set: Function 1D 3a

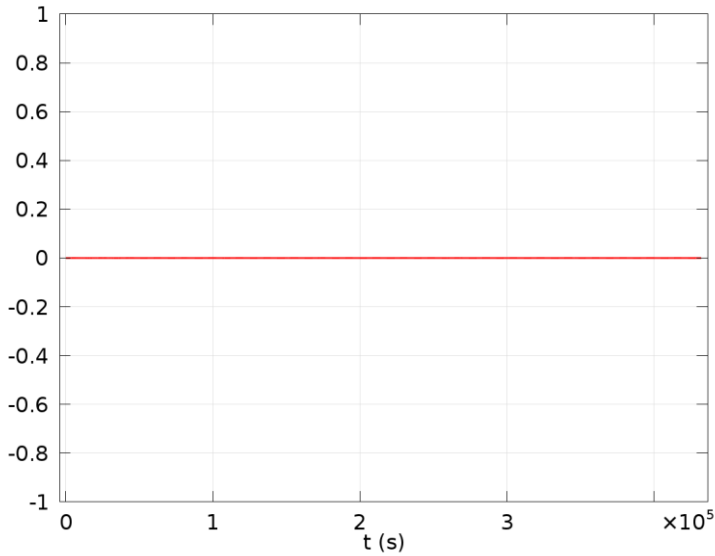
### 6.1.21 Function 1D 1b

#### Function

Name	Value
Function	pdl04033

#### Parameter bounds

Name	Value
Name	t
Minimum	0
Maximum	432000



Data set: Function 1D 1b

### 6.1.22 Cut Point 1D 3

#### Data

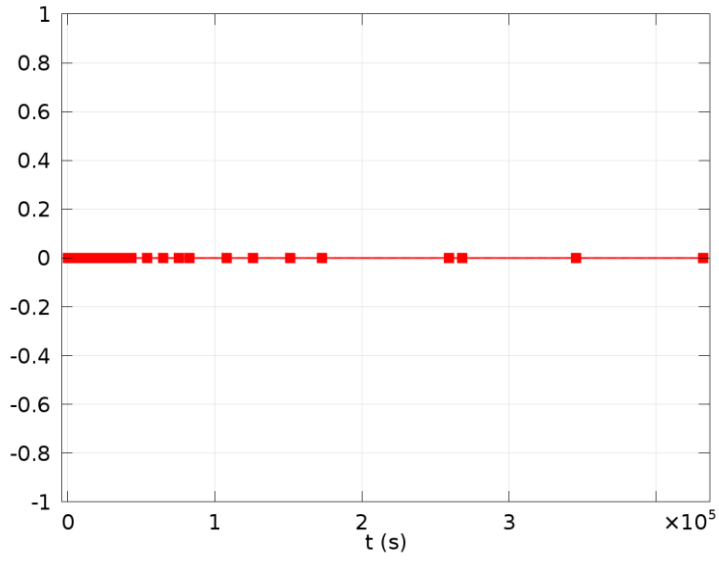
Name	Value
Data set	Function 1D 1b

#### Point data

Name	Value
Entry method	Coordinates

#### Settings

Name	Value
t	{0, 900, 1800, 2700, 3600, 4500, 5400, 6300, 7200, 8100, 9000, 9900, 10800, 12600, 14400, 16200, 18000, 19800, 21600, 25200, 28800, 32400, 36000, 39600, 43200, 54000, 64800, 75600, 108000, 82800, 151200, 172800, 126000, 259200, 268200, 345600, 432000}



Data set: Cut Point 1D 3

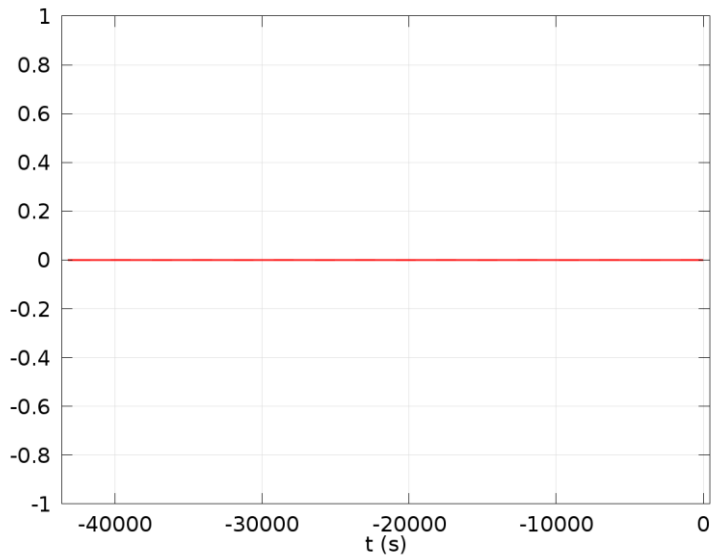
### 6.1.23 Function 1D 2b

#### Function

Name	Value
Function	pdl04033

#### Parameter bounds

Name	Value
Name	t
Minimum	-43200
Maximum	0



Data set: Function 1D 2b

### 6.1.24 Function 1D 3b

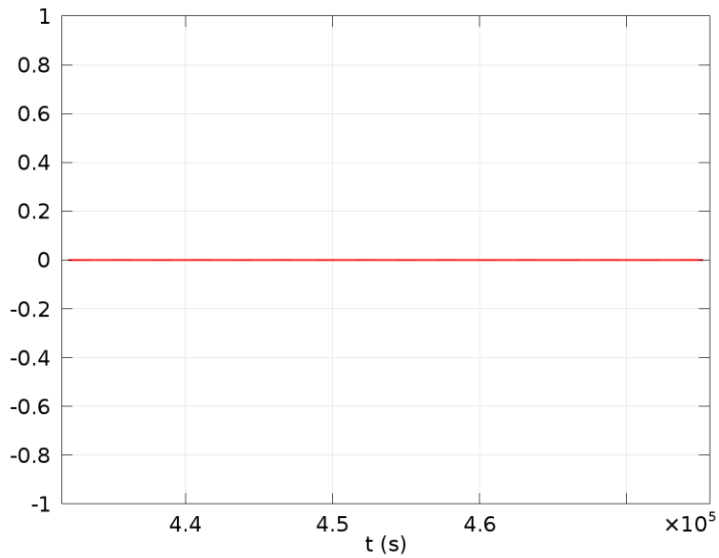
#### Function

Name	Value
Function	pdl04033

#### Parameter bounds

Name	Value
Name	t
Minimum	432000
Maximum	475200





Data set: Function 1D 3b

## 6.2 Derived Values

### 6.2.1 PLA Probe 1

#### Data

Name	Value
Data set	PLA Probe 1

#### Expression

Name	Value
Expression	amp
Unit	mol/m <sup>3</sup>
Description	Concentration

### 6.2.2 Medio Probe 2

#### Data

Name	Value
Data set	Medio Probe 2

#### Expression

Name	Value
Expression	amp
Unit	mol/m <sup>3</sup>
Description	Concentration

### 6.2.3 Total Probe 3

#### Data

Name	Value
Data set	Total Probe 3

#### Expression

Name	Value
Expression	amp
Unit	mol/m <sup>2</sup>
Description	Concentration

### 6.2.4 Domain Probe 4

#### Data

Name	Value
Data set	Domain Probe 4

#### Expression

Name	Value
Expression	c
Unit	mol/m <sup>3</sup>
Description	Concentration

### 6.2.5 Domain Probe 5

#### Data

Name	Value
Data set	Domain Probe 5

#### Expression

Name	Value
Expression	c2
Unit	mol/m <sup>3</sup>
Description	Concentration

## 6.3 Tables

### 6.3.1 Probe Table 1

#### Probe Table 1

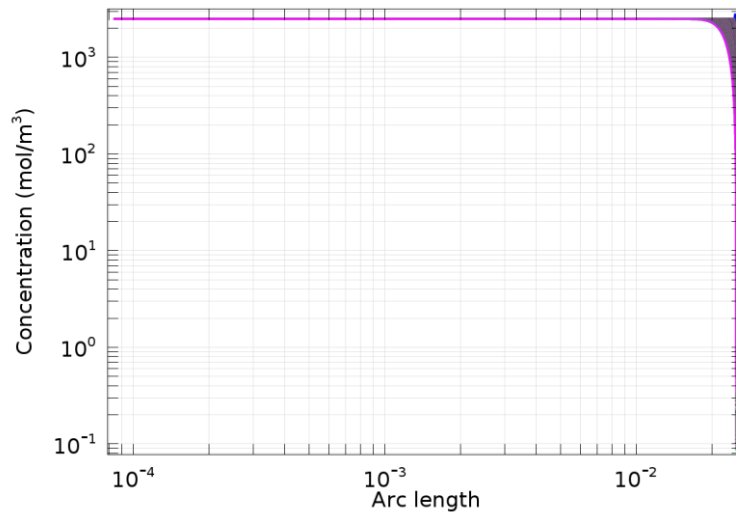
<b>t</b>	<b>Concentration (mol/m<sup>3</sup>), PLA Probe 1</b>	<b>Concentration (mol/m<sup>3</sup>), Medio Probe 2</b>	<b>Concentration (mol/m<sup>2</sup>), Total Probe 3</b>	<b>Concentration (mol/m<sup>3</sup>), Domain Probe 4</b>	<b>Concentration (mol/m<sup>3</sup>), Domain Probe 5</b>
0.0000	2490.1	0.072333	0.062884	0.082827	0.017786
0.69894	2490.1	0.072246	0.062884	0.082637	0.017698
1.3979	2490.1	0.072251	0.062884	0.082632	0.017693
2.7958	2490.1	0.072274	0.062884	0.082649	0.017697
5.5915	2490.1	0.072312	0.062884	0.082665	0.017696
11.183	2490.1	0.072389	0.062884	0.082701	0.017697
22.366	2490.0	0.072546	0.062884	0.082779	0.017699
44.732	2489.9	0.072857	0.062884	0.082934	0.017705
89.465	2489.7	0.073469	0.062884	0.083242	0.017716
178.93	2489.3	0.074656	0.062883	0.083853	0.017738
357.86	2488.5	0.076904	0.062883	0.085056	0.017782
715.72	2487.0	0.080989	0.062882	0.087389	0.017870
1073.6	2485.7	0.084735	0.062882	0.089652	0.017957
1431.4	2484.4	0.088200	0.062881	0.091851	0.018045
2147.1	2482.2	0.094600	0.062879	0.096106	0.018218
2862.9	2480.1	0.10028	0.062877	0.10015	0.018390
4294.3	2476.5	0.11016	0.062874	0.10767	0.018729
5725.7	2473.4	0.11855	0.062870	0.11452	0.019064
7157.2	2470.7	0.12592	0.062865	0.12082	0.019392
8588.6	2468.2	0.13256	0.062861	0.12667	0.019715
11451	2463.7	0.14441	0.062851	0.13731	0.020347
14314	2459.6	0.15470	0.062841	0.14679	0.020958
17177	2456.0	0.16386	0.062830	0.15534	0.021550
20040	2452.6	0.17215	0.062818	0.16318	0.022124
25766	2446.5	0.18688	0.062793	0.17723	0.023219
31492	2441.0	0.19959	0.062766	0.18951	0.024250
37217	2435.9	0.21078	0.062737	0.20040	0.025221
48669	2426.7	0.22999	0.062675	0.21923	0.027005
60120	2418.6	0.24581	0.062609	0.23491	0.028596

t	Concentration (mol/m <sup>3</sup> ), PLA Probe 1	Concentration (mol/m <sup>3</sup> ), Medio Probe 2	Concentration (mol/m <sup>2</sup> ), Total Probe 3	Concentration (mol/m <sup>3</sup> ), Domain Probe 4	Concentration (mol/m <sup>3</sup> ), Domain Probe 5
71572	2411.1	0.25911	0.062538	0.24821	0.030020
83023	2404.1	0.27048	0.062464	0.25967	0.031298
1.0593E5	2391.4	0.28915	0.062307	0.27832	0.033500
1.2883E5	2379.8	0.30340	0.062141	0.29288	0.035297
1.5173E5	2369.0	0.31438	0.061968	0.30429	0.036770
1.7463E5	2358.9	0.32288	0.061789	0.31327	0.037984
2.1783E5	2341.0	0.33438	0.061442	0.32484	0.039734
2.6103E5	2324.3	0.34131	0.061085	0.33235	0.040948
3.0423E5	2308.4	0.34519	0.060722	0.33655	0.041788
3.4743E5	2293.1	0.34709	0.060356	0.33913	0.042381
3.9063E5	2278.2	0.34775	0.059988	0.34039	0.042814
4.3383E5	2263.4	0.34773	0.059620	0.34079	0.043149

## 6.4 Plot Groups

### 6.4.1 Concentration (tds)

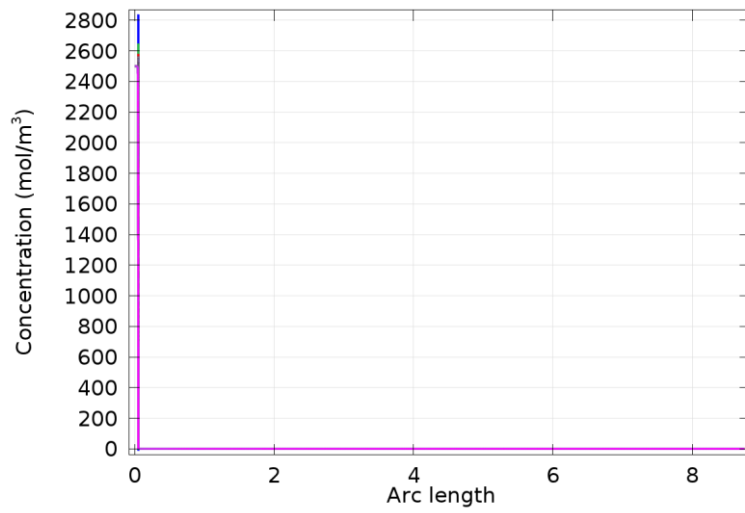
Line Graph: Concentration (mol/m<sup>3</sup>)



Line Graph: Concentration (mol/m<sup>3</sup>)

### 6.4.2 Concentration (tds2)

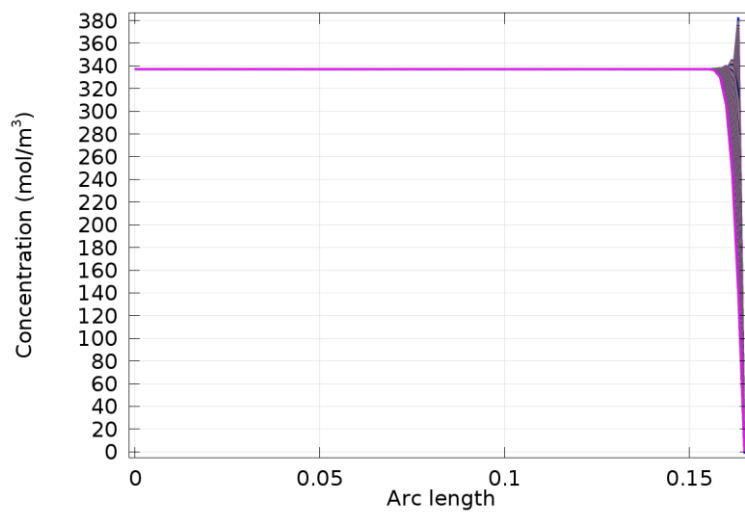
Line Graph: Concentration (mol/m<sup>3</sup>)



Line Graph: Concentration (mol/m<sup>3</sup>)

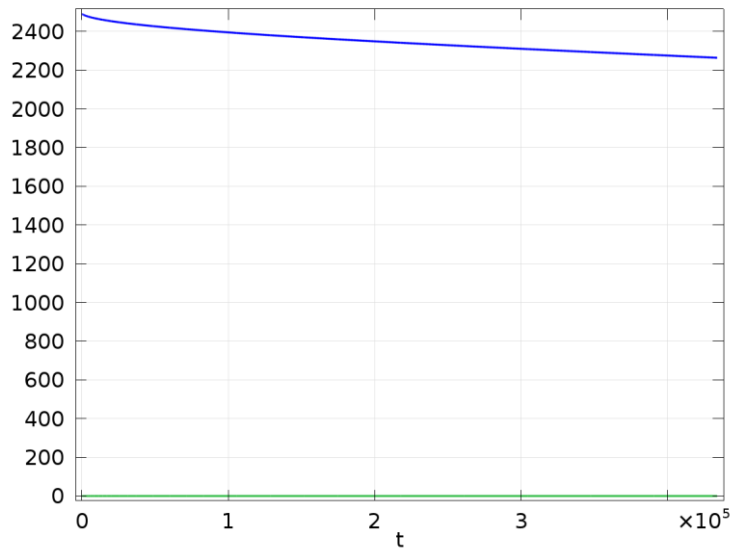
### 6.4.3 Concentration (tds3)

Line Graph: Concentration (mol/m<sup>3</sup>)



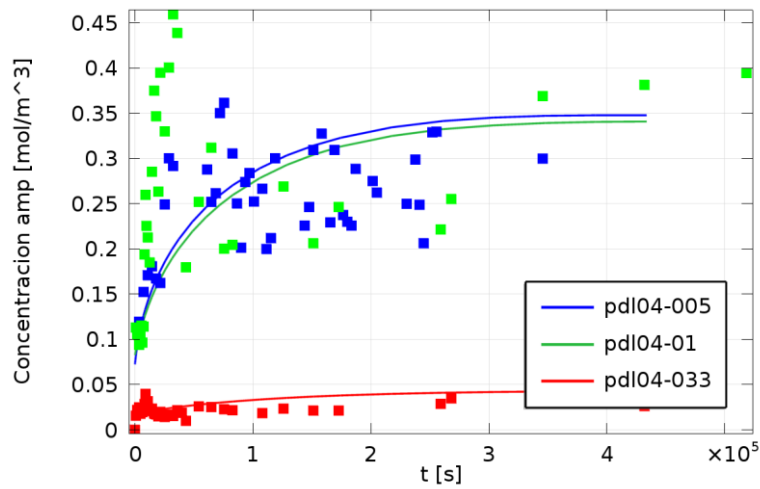
Line Graph: Concentration (mol/m<sup>3</sup>)

#### 6.4.4 Probe Plot Group 4



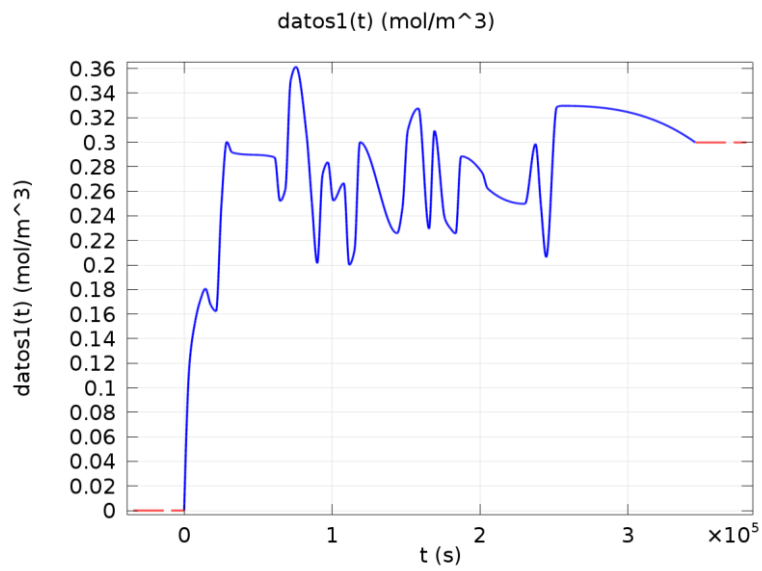
#### 6.4.5 Probe Plot Group 5

Point Graph: datos1(root.t[s]) Point Graph: datos2(root.t[s])  
Point Graph: datos3(root.t[s])



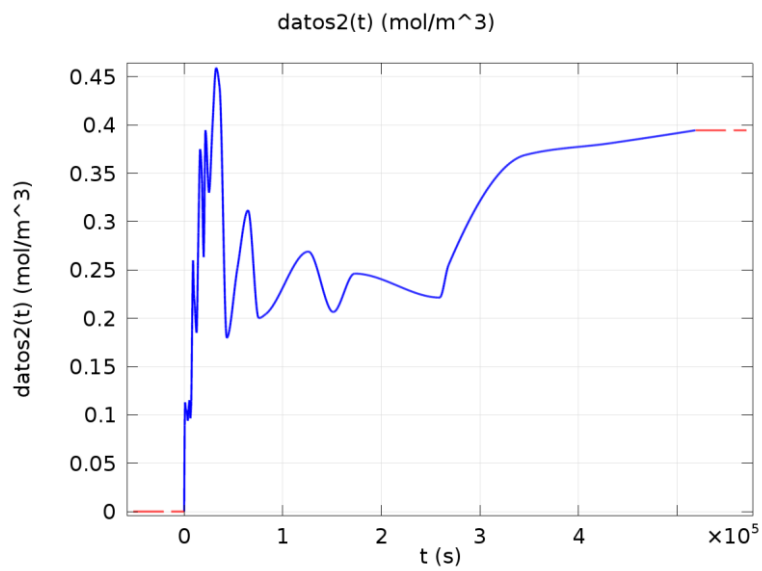
Point Graph: datos1(root.t[s]) Point Graph: datos2(root.t[s]) Point Graph: datos3(root.t[s])

### 6.4.6 1D Plot Group 6



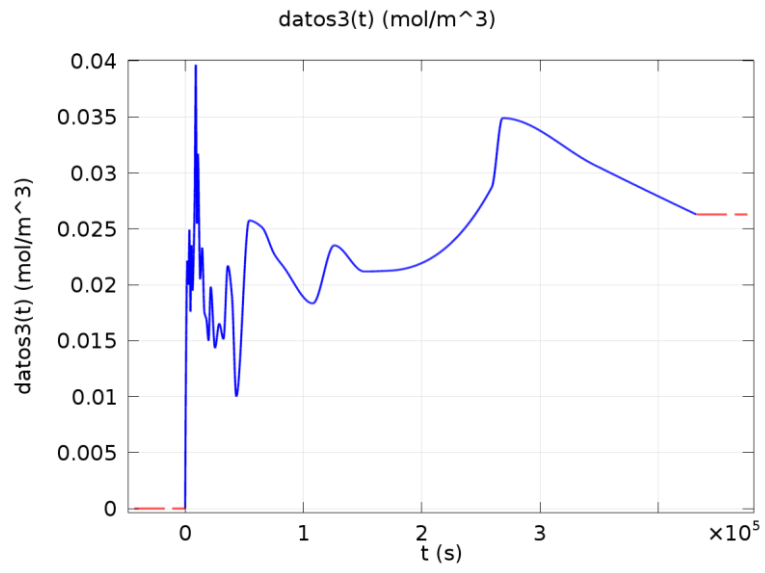
*datos1(t) (mol/m<sup>3</sup>)*

### 6.4.7 1D Plot Group 7



*datos2(t) (mol/m<sup>3</sup>)*

### 6.4.8 1D Plot Group 8



datos3(t) (mol/m<sup>3</sup>)