

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



“Diseño, desarrollo y caracterización de impresos 3D destinados a la entrega de fármacos para el tratamiento de enfermedades crónicas. Combinación de estereolitografía y nanopartículas de oro de diferentes morfologías.”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de especialización Toxicología y Diagnóstico molecular y memoria para optar al título profesional Químico farmacéutico por :

Ignacia Paz Torres Fredes

Directores de tesis:

Dr. Marcelo Javier Kogan

Dr. Daniel Real

Santiago de Chile – 2024

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de ciencias Químicas y Farmacéuticas

Informe de aprobación de Tesis de Magister

Se informa a la dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata:

Ignacia Paz Torres Fredes

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Química Farmacéutica, en el examen público rendido el día:

Director de Tesis:

Dr. Marcelo Kogan

Co-director de Tesis:

Dr. Daniel Real

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Soledad Bollo _____

Dr. José Vicente González _____

Dr. Roberto Lemus _____

Dedicatoria:

A mi madre y a mis abuelos que han sido un apoyo fundamental durante toda mi vida, gracias a ustedes soy quien soy y estoy aquí.

A mis amigos y a todos quienes han participado de alguna manera en mi formación personal y académica. A quienes no están físicamente pero siempre estarán conmigo en mi corazón. A mi sol, compañera de vida.

“Siempre nos hemos definido por la capacidad de superar lo imposible. Y contamos estos momentos. Estos momentos cuando nos atrevemos a apuntar más alto, para romper las barreras, para alcanzar las estrellas, para hacer lo desconocido, conocido”

Interestelar.

Agradecimientos:

A mis directores de tesis por creer en mis capacidades, por permitirme participar en sus líneas de investigación y guiarme durante todo el proceso de tesis.

Al profe Marcelo por reconocer el potencial y las ganas con las que me presenté al laboratorio a principios del 2019. Gracias por la empatía y la humanidad en cada una de las conversaciones y momentos claves para el desarrollo de esta tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio, en especial Andreas, Ellie, Orlando y Renzo gracias por su disposición, apañe y entrega. A cada uno lo admiro muchísimo y son mis referentes en la ciencia. Gracias por ser mis guías, por orientarme y por escucharme cuando lo necesité.

A mi familia, por siempre apoyarme en el camino que escogí para cumplir mis sueños. A mi cote que se convirtió en la hermana que siempre soñé con tener, gracias por tantas risas, llantos y apañe durante todos estos años, siempre contarás conmigo.

A mis chicas super poderosas, fer y feña por estar durante todos estos años apañándonos tanto en lo académico como en lo emocional, lo logramos chicas, las amo. A Ernesto por apañarme a mí y a sol desde que nos conocimos en la facultad, siempre encontrarás un hogar con nosotras. A Giovanni por enseñarme a observar y entender mi mundo interior y por escucharme cada una de las veces que tenía algo para decir. A Víctor por siempre creer en mí y por ser mi familia, especialmente los domingos comiendo pastel de choclo.

Mi vida estos últimos 8 años no hubiese sido una de las etapas más lindas si no fuera por ustedes, gracias infinitas.

A mis amigos de Valparaíso Nacho, Cami, Oliver ustedes me conocen desde que tengo conciencia y son parte de mi y de mi historia, mis triunfos son suyos. A la vale y camí por siempre tener un espacio en su hogar para mí, por los cafecitos, desayunos con avena y tardes de estudio.

A mi grupo de teatro y a la selección de handball por darme la oportunidad de desarrollar otras áreas diferentes a la científica y por enseñarme el trabajo en equipo y la colaboración, los llevaré siempre conmigo.

Al arte y a la música que siempre serán mi vía de escape, mi lugar seguro.

Muchas gracias.

ÍNDICE

Dedicatoria:	2
Agradecimientos:	3
Índice de figuras:	6
Resumen:	8
Capítulo 1 Introducción:	10
Desafíos de la administración espacio temporal controlada de fármacos:	10
Nanotecnología	11
Nanopartículas de oro	12
Impresión 3D	13
Estereolitografía SLA	14
Materiales para SLA	16
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
Capítulo 2: Materiales y Métodos.	22
2.1 Materiales:	22
2.2 Metodología	23
Esquema general de metodología:	23
2.3 Síntesis de Nanopartículas de Oro	24
2.3 Espectrofotometría UV-Vis.	25
2.4 Determinación de diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad:	25
2.5 Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).	25
2.6 STEM	26
2.7 Diseño de matrices para Impresión en 3D	26
2.8 Evaluación de solubilidad de niclosamida en matrices:	26
2.9 Reología	26
2.10 Proceso de Impresión en 3D	27
2.11 Microscopía Óptica	27
2.12 Espectroscopía infrarroja	27
2.13 Resonancia magnética nuclear de fosforo	28
2.14 Uniformidad de Peso	28
2.15 SEM	28
2.16 Evaluación de efecto fototérmico:	29
2.17 Para la Evaluación de la Liberación sin Irradiación y el Equilibrio de Solubilidad en Fase por Espectrofotometría UV-Vis.	29

2.18 Para evaluar la liberación mediante irradiación con láser por Espectrofotometría UV-Vis:	30
2.19 Para el análisis estadístico:	30
2.20 Estudios de liberación con y sin irradiación por Cromatografía Líquida (HPLC)	30
Capítulo 3 Resultados y Discusión	32
Objetivo específico 1	32
Objetivo específico 2:	39
PEGDA 250	40
PEGDA 575	52
Objetivo específico 3	72
Conclusiones generales:	75
Referencias:	76

Índice de figuras:

Figura 1. Representación Efecto SPLR nanopartículas de oro.	12
Figura 2 Estructura orgánica de polietilenglicol di acrilato (PEGDA)	16
Figura 3 Estructura orgánica Difenil (2,4,6- trimetilbenzoil) Óxido de fosfina)	17
Figura 4 Mecanismo de fotopolimerización propuesto de PEGDA y TPO.	18
Figura 5 Estructura orgánica Polietilenglicol (PEG)	18
Figura 6 Estructura orgánica niclosamida	19
Figura 7 Esquema representativo de Metodología General	22
Figura 8 Esquema representativo de metodología de la preparación de muestras para ensayo de análisis estructural SEM.	28
Figura 9 : a) Caracterización AuNEs por espectrofotometría UV-Vis b) Caracterización AuNRs por espectrofotometría UV-Vis, c) Caracterización AuNRs 1 por espectrofotometría UV-Vis.	31
Figura 10 Análisis de seguimiento de nanopartículas NTA. Diámetro.	34
Figura 11 a) Caracterización AuNEs por STEM b) Caracterización AuNRs 2 por STEM c) Caracterización AuNRs 1 por STEM.	35
Figura 12 Gráfico de superficie respuesta de la solubilidad de niclosamida en 13 matrices con PEGDA 575 y 13 matrices con PEGDA 250	38
Figura 13 Imágenes de las matrices 2, 3, 5 y 6 posterior a la incorporación de todos los componentes que conforman la matriz.	40
Figura 14 a) Viscosidad versus velocidad de corte PEG 400, PEGDA 250, matrices 2, 3, 5 y 6 b) Curva de flujo, fuerza de corte versus velocidad de corte. Para PEG 400, PEGDA 250, matrices 2, 3, 5 y 6	41
Figura 15 Imágenes obtenidas por microscopía óptica de los impresos resultantes de las matrices 2, 3, 5 y 6 con PEGDA 250.	42
Figura 16 a) Caracterización de impresos con AuNEs de la matriz 6 mediante SEM de manera superficial. b) Caracterización SEM de manera lateral	43
Figura 17 Efecto fototérmico de dispositivos sólidos de matriz 6 con AuNEs. a) Temperatura inicial del dispositivo. b) Temperatura tras 5 min de irradiación.	44
Figura 18 Curva de calibración de niclosamida en acetonitrilo mediante Espectrofotometría UV-Vis.	45
Figura 19. Perfiles de liberación de niclosamida desde dispositivos sólidos impresos en 3D de la matriz 2, 3, 5 y 6 sin irradiación, suspendidas en un medio PBS a 25 °C.	46

Figura 20 Perfil de liberación de niclosamida desde dispositivos sólidos obtenidos de la matriz 6 con AuNEs y PEGDA 250.	48
Figura 21 Espectros de absorción PEG, PEGDA, TPO y niclosamida por UV-Vis.	49
Figura 22. a) Imágenes de las matrices 2, 3, 5 y 6 tras la incorporación de todos los componentes de la matriz. b) y c) Caracterización AuNRs2 y AuNRs1 respectivamente en matriz polimérica por espectrofotometría UV-Vis.	51
Figura 23 a) Viscosidad aparente Matrices PEGDA 575 b) Curva de flujo Matrices PEGDA 575	52
Figura 24 Imágenes obtenidas por microscopía óptica de los impresos resultantes de las matrices 3 y 5 con PEGDA 575	53
Figura 25. a) Imágenes del dispositivo impreso resultante de la matriz 6 con PEGDA 575 b) 1. Dispositivo previo al proceso de curado b) 2. Dispositivo posterior al proceso de curado	53
Figura 26. niclosamida en cristales mediante microscopía electrónica de barrido	55
Figura 27. Microscopía electrónica de dispositivos impresos de la Matriz 6 con AuNRs 2 de PEGDA 575 sometidos a distintas condiciones.	58
Figura 28 Matriz 5 AuNRs 2 PEGDA 575 por microscopía electrónica de barrido.	59
Figura 29. Análisis elemental de dispositivo sólido de matriz 6 AuNRs 2 PEGDA 575.	60
Figura 30. Efecto fototérmico de dispositivos impresos de la matriz 6 PEGDA 575 tras la irradiación a 1064 nm por 5 min	61
Figura 31. Resonancia magnética nuclear de fosforo de matrices 5 y 6 sólidas y líquidas con AuNRs2 y PEGDA 575.	62
Figura 32. Espectros IR de muestras sólidas y líquidas de las matrices 5 y 6 con AuNRs2 y PEGDA 575.	63
Figura 33 Curva de calibración de niclosamida en PBS Tween 80 1% por HPLC. Rango de concentraciones desde 1 mg/L hasta 25 mg/L.	64
Figura 34. Perfiles de liberación de niclosamida desde dispositivos impresos sólidos de la matriz 6 PEGDA 575 con AuNRs 2, AuNRs 1 y Sin Au.	67
Figura 35. Liberación de niclosamida sin irradiación desde dispositivos de la matriz 6 con PEGDA 575	69
Figura 36. Imagen de los dispositivos bicapa con AuNRs 2 y AuNRs 1	72
Figura 37. Liberación de niclosamida desde dispositivo bicapa tras la irradiación a 808 nm y 1064 nm	73

Resumen:

Las nanopartículas (NPs) de oro generan calor al ser irradiadas gracias a sus propiedades asociadas al fenómeno del plasmón superficial. Estas propiedades son dependientes del tamaño y de la morfología, pudiendo aplicarse esto a la liberación controlada de activos con el objetivo de evitar las interacciones en sitios no específicos y así reducir los efectos secundarios. Por otro lado, la impresión en 3D es una técnica innovadora de fabricación aditiva que permite combinar múltiples materiales en un mismo dispositivo y adaptar las formulaciones a geometrías personalizadas y precisas, difíciles de conseguir con otras metodologías. Asimismo esto puede aplicarse al diseño de dispositivos farmacéuticos innovadores. En este sentido, la estereolitografía es la técnica 3D que presenta la mayor definición y la ventaja de trabajar en solución, sin aplicar temperatura, siendo esto favorable para la incorporación de nanosistemas dentro de los materiales para impresión.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar la inclusión de nanopartículas de oro (AuNPs) de 2 morfologías distintas, Nanoesferas (AuNEs) y Nanobarras (AuNRs), en matrices poliméricas mediante la técnica de impresión 3D de estereolitografía, para permitir la liberación diferencial controlada de fármacos gracias a la irradiación a dos longitudes de onda diferentes.

Como fármaco modelo se utilizará la niclosamida, un fármaco derivado del ácido salicílico y que pertenece a clase II según el sistema de clasificación biofarmacéutico (SCB). Este fármaco inicialmente se utilizó como antihelmíntico, pero en la actualidad se ha reposicionado contra diferentes tipos de cáncer y COVID -19.

En primer lugar, se deben encontrar los materiales adecuados para desarrollar matrices poliméricas sensibles a la luz destinadas a ser dispositivos impresos que sean capaces de responder frente a un estímulo como lo es la irradiación. Para esto se debe encontrar una región de trabajo en donde los materiales utilizados sean imprimibles, permitan la correcta solubilización del activo y contengan nanopartículas de oro destinadas a terapia fototérmica.

Se utilizaron mezclas ternarias combinando un fotopolímero (PEGDA), un cosolvente (PEG) y agua (en donde los nanosistemas se encontraron disueltos). Se desarrolló un diseño de mezclas simples, mediante el *software Design Expert* en donde se evaluó la solubilidad del fármaco en las mezclas ternarias y se escogieron aquellas que tengan mayor potencial para el

desarrollo del dispositivo.

Una vez optimizados los materiales, se procedió a la etapa de impresión en 3D por la técnica de estereolitografía en donde se tuvo como objetivo que los materiales escogidos sean capaces de dar origen a estructuras sólidas tridimensionales precisas y reproducibles.

Finalmente, obtenido los dispositivos impresos, estos se debieron pasar por una serie de caracterizaciones en donde estudió la inclusión de los nanosistemas de oro, la correcta carga y estabilidad del activo y la liberación de este mismo desde el dispositivo frente a diferentes estímulos. Adicionalmente se generó un dispositivo bicapa que contiene dos tipos de nanosistemas que responden a la irradiación a longitudes de onda distintas, permitiendo así la liberación controlada del fármaco modelo niclosamida pudiéndose también adaptar la geometría de este para su uso por diferentes vías de administración.

Mediante los perfiles de liberación, se comprobó que la incorporación de nanosistemas a materiales de impresión en 3D aumentaron la contribución de la liberación por difusión Fickiana del fármaco. Los perfiles ajustaron al modelo matemático de Peppas-Sahlin que describe el mecanismo de liberación de fármacos a partir de sistemas poliméricos

Los dispositivos impresos fueron capaces de controlar la liberación del activo gracias a la incorporación de nanopartículas y la irradiación con láser de 808 nm y 1064 nm.

Capítulo 1 Introducción:

Desafíos de la administración espacio temporal controlada de fármacos:

Para que un fármaco pueda desencadenar su efecto terapéutico, la molécula debe interactuar en un lugar específico de acción y provocar una respuesta farmacológica deseada. El propósito principal de una formulación farmacéutica radica en la administración segura y eficaz del fármaco, permitiendo alcanzar concentraciones plasmáticas dentro de los rangos terapéuticos sin exponer al paciente a niveles tóxicos. ¹

Sin embargo, la administración convencional de fármacos presenta un inconveniente fundamental: el fármaco se distribuye en todo el organismo en lugar de concentrarse exclusivamente en el sitio de acción terapéutica. Este desafío puede desencadenar problemas de seguridad al afectar órganos o tejidos no deseados. ² Además, para lograr que la cantidad necesaria de fármaco alcance su destino terapéutico, se requiere de la administración de dosis elevadas y repetitivas lo que conlleva una serie de desventajas como la aparición de efectos adversos, un mayor riesgo de intoxicación y una disminución en la calidad de vida de los pacientes. ³

Para superar estos desafíos y optimizar la administración segura de fármacos, se ha desarrollado la idea de dirigir los activos hacia su sitio de acción deseado. ⁴ Esto ha dado lugar a una variedad de estrategias relacionadas con las vías de administración y las formulaciones farmacéuticas utilizadas para entregar las moléculas activas. ^{5,6}

Las formulaciones farmacéuticas desempeñan un papel crucial al determinar parámetros biofarmacéuticos, como la liberación ^{6,7}, lo que afecta directamente la biodisponibilidad, eficacia y potencia del fármaco. ¹ Las formulaciones de liberación controlada permiten ajustar la velocidad de liberación y, por lo tanto, el tiempo que la molécula permanece en el organismo. ⁶ Además, estas formulaciones pueden ser diseñadas para liberar el fármaco en un lugar y momento específicos, promoviendo así su interacción en el sitio de acción terapéutico.

Para que un dispositivo sea capaz de controlar la cinética de liberación de un activo, la formulación debe ser capaz de responder frente a un estímulo que determine el momento y mecanismo de liberación. ⁸

Existen estímulos internos, como cambios de pH, presencia de iones o presencia de enzimas, sin embargo, estos presentan una alta intervariabilidad y dependen de las condiciones de cada paciente.⁹

Por otro lado, existen estímulos externos como, por ejemplo, el magnetismo, ultrasonido o la luz que no dependen de las condiciones fisiológicas del paciente lo que los hacen estímulos ideales para activar mecanismos de liberación.¹⁰

En este contexto la nanotecnología ha generado gran interés. Esta tecnología permite la síntesis de nanopartículas que actúan como verdaderas “antenas” que son capaces de generar respuestas específicas cuando son expuestas a estímulos.¹¹

Nanotecnología

La reducción del tamaño de partículas a escalas nanométricas conlleva beneficios significativos en diversas aplicaciones científicas. Estos beneficios incluyen el aumento de la relación superficie/volumen, lo que facilita la funcionalización de las nanopartículas¹². La funcionalización permite la adhesión de moléculas en la superficie de las nanopartículas, lo que, a su vez, simplifica su direccionamiento.¹³ Además, la reducción del tamaño de partícula mejora la velocidad de disolución de principios activos poco solubles, incrementando su biodisponibilidad y su capacidad de traspasar membranas biológicas.¹⁴

En la síntesis de nanopartículas, se dispone de una amplia variedad de materiales tanto orgánicos como inorgánicos, cada uno con propiedades únicas y aplicaciones específicas. Dentro de las nanoestructuras orgánicas, destacan nanomicelas, nanoliposomas, nanocápsulas, dendrímeros y nanopartículas poliméricas.^{15,16}

Los nanomateriales metálicos presentan propiedades ópticas y magnéticas únicas¹¹ que surgen debido a su interacción con la luz. Entre estos materiales, el oro destaca por su biocompatibilidad, baja citotoxicidad y estabilidad. Estas características hacen que el oro sea un candidato muy prometedor para aplicaciones en el ámbito de la biomedicina y la nanomedicina.¹⁷

Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (NPAu) presentan propiedades ópticas y electromagnéticas, entre las que destaca el fenómeno del efecto plasmónico.¹⁸ Este efecto se debe a la alta densidad electrónica en la superficie de las nanopartículas de oro, particularmente en su banda de conducción, lo que permite que los electrones en esta zona se muevan libremente. La resonancia local plasmónica de superficie (SPLR, por sus siglas en inglés)¹⁹ es un fenómeno que involucra la oscilación colectiva y sincronizada de los electrones en la capa superficial de los átomos que componen la nanoestructura (Figura 1). Esta oscilación y excitación se desencadenan como resultado de la interacción de la nanopartícula con la luz. Esta interacción resulta en un aumento de la disipación local de la energía, lo que, en el caso de las nanopartículas de oro, genera fototermia.^{12,20}

La morfología de la nanopartícula es determinante en la energía requerida para inducir el SPLR.²¹ Esto se debe a que el tamaño y la forma de la nanopartícula limitan el movimiento de los electrones en el sistema. En el caso de nanopartículas con alta densidad electrónica en la superficie, como las nanobarras de oro (AuNRs)²², la energía requerida para excitar a esos electrones es menor, lo que se traduce en una longitud de onda más larga, ya que existe una relación inversa entre ambos factores. Por esta razón, el plasmón de las AuNRs de segunda ventana biológica (AuNRs 2) se encuentra en torno a los 1064 nm, mientras que el de las nanoesferas (AuNEs), con una menor área superficial, se ubica cerca de los 530 nm.

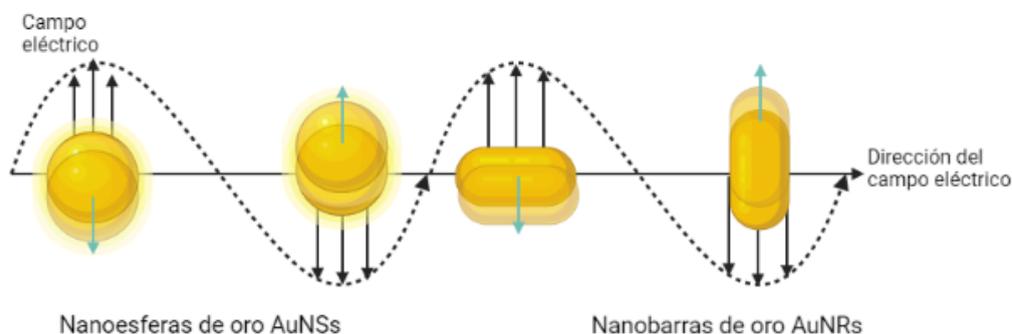


Figura 1. Representación del efecto de resonancia local plasmónica de superficie (SPLR) de las nanopartículas de oro. Imagen obtenida de Biorrender.

Controlando las condiciones de síntesis se pueden obtener diversas estructuras y morfologías con diferentes plasmones característicos. Esto cobra esencial sentido al sintetizar nanopartículas que respondan a longitudes de onda ubicadas las regiones de infrarrojo cercano NIR pudiendo generar aplicaciones en la biomedicina.²²

El infrarrojo cercano es una región del espectro electromagnético que se encuentra cercano al espectro visible, con longitudes de onda desde los 650 hasta los 2500 nm²³. Esta región no es visible para el ojo humano y las biomoléculas como el agua, la hemoglobina y los tejidos biológicos presentan una baja absorción y dispersión en esta zona lo que la hace ideal para aplicaciones en la medicina.²⁴ Algunos materiales como las nanopartículas de oro son capaces de interactuar con la radiación en estos rangos permitiendo una alta penetración del tejido sin producir efectos indeseados en los tejidos.

Se han descrito 3 de estas zonas llamadas ventanas biológicas.²⁵

1° Ventana Biológica NIR I: 650 -950 nm

2° Ventana Biológica NIR II: 1000-1350 nm

3° Ventana Biológica: NIR III: 1500-1800 nm

Las propiedades de estas nanopartículas plasmónicas representan una potencial herramienta para la medicina, ya que pueden aplicarse de diversas maneras, desde el direccionamiento de fármacos y el control de la liberación hasta la terapia fototérmica^{20,26}. La capacidad de ajustar la longitud de onda del SPLR según la forma y el tamaño de las nanopartículas ofrece una gran versatilidad en la manipulación de estos materiales para aplicaciones biológicas.²⁷

Es esencial destacar que, debido a su naturaleza coloidal, las nanopartículas necesitan ser estabilizadas para evitar la aglomeración y permitir su dispersión en un solvente apropiado.²⁸ Esta estabilización se puede lograr mediante un agente estabilizante que contrarreste las fuerzas de atracción entre las partículas y controle el proceso de agregación de los átomos metálicos, lo que puede lograrse a través de efectos electrostáticos, impedimento estérico, o una combinación de ambos.²⁹

Un ejemplo destacado de estabilización es la formación de enlaces covalentes por medio de moléculas de tiol en las nanopartículas de oro.³⁰ Los átomos de oro reaccionan con los grupos sulfhidrilos (SH) de las moléculas con las cuales se funcionalizan las nanopartículas de oro, creando enlaces covalentes Au-S.²⁸ Esta estabilización a través de enlaces covalentes

contribuye a la estabilidad de las nanopartículas de oro empleando moléculas como los polietilenglicoles terminados en SH.¹²

Una de las estrategias innovadoras utilizadas para la incorporación de nanopartículas en formulaciones farmacéuticas es la tecnología de impresión en 3D.³¹ Esta técnica abre nuevas oportunidades en el campo de la nanomedicina y la terapia fototérmica al permitir la producción de formulaciones farmacéuticas personalizadas de diversos materiales que permiten la incorporación de nanopartículas de oro.³²

Impresión 3D

La impresión en 3D es una técnica de fabricación aditiva que se caracteriza por la creación de objetos sólidos tridimensionales a partir de instrucciones contenidas en un archivo digital³³. En líneas generales, la tecnología de impresión en 3D permite:

- La creación de estructuras sólidas con precisión y personalización, en una gran variedad de tamaños y formas.³⁴
- La capacidad de combinar materiales con propiedades fisicoquímicas diferentes, se pueden generar tintas con moléculas activas o nanomateriales, los cuales pueden ser distribuidos en distintas capas o superficies del objeto impreso sin mezclarse entre sí.³⁵
- La posibilidad de generar geometrías innovadoras, como estructuras huecas o porosas, que son difíciles de lograr con métodos tradicionales.³⁶

Gracias a los beneficios que entrega la impresión en 3D, se abre la posibilidad de poder personificar las terapias y crear nuevas formulaciones farmacéuticas sólidas específicas para grupos de pacientes con necesidades particulares, como niños, pacientes geriátricos o disfagia.^{34,37}

Además de permitir la liberación controlada o sostenida y la dosificación individualizada de activos, la impresión en 3D permite obtener objetos sólidos con una gran variedad de posibilidades, permitiendo el diseño de formulaciones farmacéuticas especializadas que se pueden adaptar a diversas condiciones fisiológicas de los pacientes.³⁸ Los diseños de impresión en 3D se pueden obtener mediante el uso de *softwares* asistidos por modelador (CAD)³⁹, esta técnica permite crear, analizar y diseñar planos en modelos de tres dimensiones. Por otro lado, los diseños digitales también se pueden obtener a partir de

técnicas de imagen en tiempo real, como la resonancia magnética RM o tomografía computarizada TC, esto representaría la posibilidad de generar dispositivos geoméricamente adaptados a la anatomía individual de los pacientes permitiendo un mayor énfasis en la personalización de la terapia.⁴⁰

Estereolitografía SLA

Dentro del amplio espectro de técnicas de impresión en 3D, destaca la estereolitografía (SLA) como una de las técnicas con mayor precisión, adicionalmente permite trabajar en solución y a temperatura ambiente siendo amigable para la incorporación de moléculas termosensibles.

⁴¹

En esta técnica, se emplean resinas líquidas que se solidifican o se “curan” mediante la exposición a un láser por un proceso de fotopolimerización.⁴² El sistema SLA más común es la estereolitografía inversa, en la cual la resina líquida se vierte en un tanque. Cuando comienza la impresión, la base, conocida como cama de impresión, se sumerge en la resina, dejando una fina capa de líquido entre la base y el fondo del tanque. En esta etapa, un láser UV se enfoca en la parte inferior del tanque de resina, esculpiendo una sección transversal del modelo 3D y endureciendo el material. De este modo, la impresión se construye mediante la adición de capas sucesivas. Cuando se completa una capa, la cama se retira desde el fondo del tanque, permitiendo que la resina líquida vuelva a fluir y se prepare para imprimir la siguiente capa.⁴⁰

El proceso de fotopolimerización puede ser desencadenado por diferentes estímulos como la luz, un haz de electrones, temperatura, entre otros.⁴³ Para este proceso se necesitan al menos tres componentes, una fuente de luz, un polímero fotopolimerizable y un fotoiniciador.^{44 45} Adicionalmente se pueden incorporar otras materias primas con el fin de modificar la resina, tales como cosolventes, fármacos o nanopartículas. El resultado final de la reacción es un sólido que suele ser insoluble.

La reacción de fotopolimerización consta de 3 etapas:

- **Iniciación:** Los componentes de la resina son irradiados por luz provocando la formación de especies radicalarias

- Propagación: Los radicales libres atacan a las unidades del polímero y se propagan. Los grupos funcionales disponibles reaccionan entre sí y se produce el entrecruzamiento formando redes reticuladas.
- Terminación: El proceso termina cuando se forman enlaces covalentes entre las redes reticuladas.⁴⁴

Generar dispositivos a partir de reacciones de polimerización brindan varias ventajas en la industria farmacéutica⁴⁶, entre ellos la capacidad de controlar la liberación de un agente mediante la modificación de parámetros tales como la concentración del polímero, la concentración del fotoiniciador o el tiempo de irradiación³⁶. Estos parámetros influyen directamente en el grado de reticulación del dispositivo final. De esta manera se pueden crear estructuras con diversos grados de reticulación según los requerimientos de la formulación y por lo tanto permitiendo controlar la liberación de los agentes activos incorporados en los impresos.⁴⁷

Para generar dispositivos cargados de fármacos mediante impresión en 3D estereolitografía se pueden seguir dos caminos. En primer lugar, se puede incorporar el activo directamente a la resina líquida previo al proceso de impresión, en este caso el fármaco se solubiliza y distribuye homogéneamente en la resina mediante agitación mecánica.⁴⁸ Posterior a la reacción de fotopolimerización que implica el proceso de impresión, las moléculas de fármacos quedan retenidas físicamente en la red reticulada y estas podrán ser liberadas cuando el dispositivo final sea sumergido en un medio de disolución que permita la liberación por difusión.⁴ En segundo lugar, el fármaco puede ser incorporado a un dispositivo en blanco mediante técnicas tradicionales de carga como por ejemplo adsorción, inmersión o recubrimiento. La ventaja de este segundo método de incorporación es que se protege a la molécula activa de la degradación que podría significar el proceso de impresión. Sin embargo, la carga del activo posterior al proceso de impresión implica un proceso de fabricación adicional y no asegura la incorporación total de la cantidad de fármaco propuesta.^{45,49}

Como se mencionó anteriormente, la impresión en 3D basada en sistemas SLA es una herramienta que otorga gran versatilidad a la hora de diseñar formas farmacéuticas innovadoras y desarrollar sistemas controlados de entrega de medicamentos. Esto significa

Otro componente fundamental de la resina es el fotoiniciador .^{2,55} Los fotoiniciadores son moléculas generalmente orgánicas, termoestables y que presentan rangos de longitudes de onda en los cuales presentan una absorción alta de energía. ⁵⁶ Estos son capaces de desencadenar las reacciones de polimerización y dependiendo de la naturaleza del fotoiniciador estas pueden ser radicalarias o iónicas. ⁵⁷ Dentro de los fotoiniciadores radicales existen: tipo I de escisión como el difenil óxido fosfina (TPO) o trimetil benzoil óxido de fosfina (BAPO) y tipo II de abstracción de hidrógeno como Camforquinona (CQ). Se ha demostrado que los fotoiniciadores tipo I tienen una mayor eficiencia de curado que los tipos II. ⁵⁸

En general el fotoiniciador debe tener una buena solubilidad en el polímero, un amplio rango de absorción y reactividad química y fotoquímica. ⁵⁹ Para las finalidades biológicas estos fotoiniciadores deben ser biocompatibles. ⁶⁰ Se ha demostrado que los fotoiniciadores menos tóxicos son aquellos que absorben en el rango UV-A que comprende longitudes de onda desde el 315 a los 400 nm. ⁵⁶ La elección del fotoiniciador va a ser determinante para parámetros como la toxicidad de la resina y la velocidad de la reacción de fotopolimerización.

Bajo estos antecedentes, se seleccionó el fotoiniciador difenil (2,4,6-trimetilbenzoil) Óxido de fosfina (TPO) (Figura 3) que pertenece al tipo I y absorbe longitudes de onda entre 365 y 425 nm. ^{57,58,60}

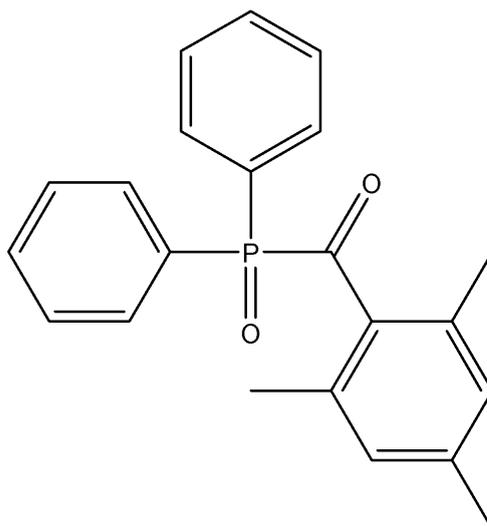


Figura 3 Estructura orgánica Difenil (2,4,6- trimetilbenzoil) Óxido de fosfina)

El mecanismo de la reacción de fotopolimerización comienza cuando la impresora somete a la molécula de TPO a irradiación con una longitud de onda a 406 nm.⁶¹ Se plantea la hipótesis de que se produce una ruptura homolítica de la molécula generando dos radicales libres que pueden reaccionar con los grupos acrilatos del PEGDA iniciando la etapa de propagación como se puede apreciar en la Figura 4. Finalmente, la reacción termina cuando se forman enlaces covalentes entre los polímeros entrecruzados.^{62,63}

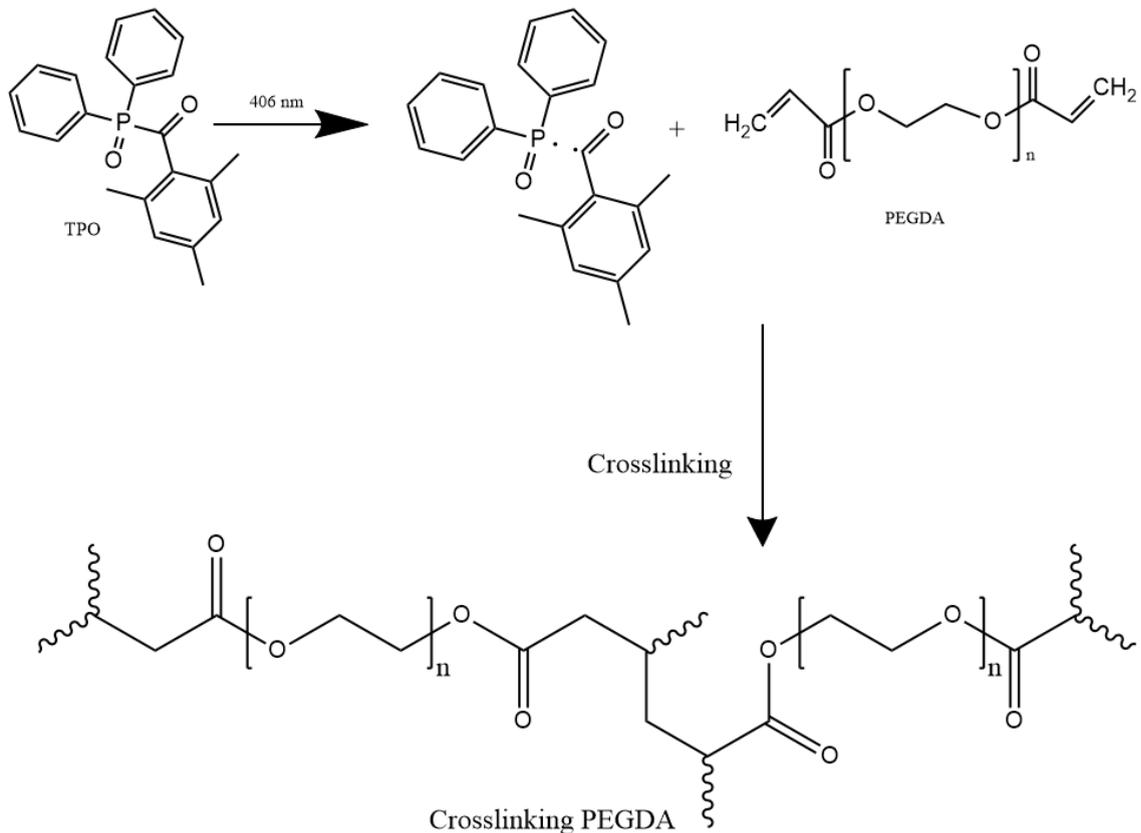


Figura 4 Mecanismo de fotopolimerización propuesto de PEGDA y TPO.

Adicionalmente, a las resinas líquidas se le pueden incorporar otras moléculas que puedan promover la solubilización de activos o servir como coadyuvantes del proceso de impresión.^{52,64} El Polietilenglicol PEG 400 (Figura 5) es un poli éter, ampliamente utilizado como disolvente debido a sus propiedades fisicoquímicas. A mayor peso molecular del PEG será más soluble en agua.⁶⁵ Para aplicaciones de este trabajo, se utilizará como co-disolvente del activo y diluyente para controlar la capacidad de reticulación del PEGDA⁶⁵. Además, es biodegradable, biocompatible y no tóxico.

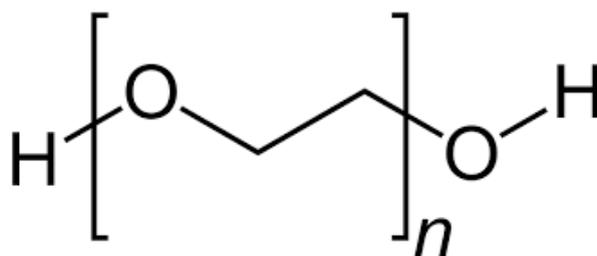


Figura 5 Estructura orgánica Polietilenglicol (PEG)

Dentro de las ventajas que ofrece la técnica de SLA con respecto a otras técnicas encontramos una alta resolución y precisión de los impresos.⁶⁶ Debido a su alta versatilidad, se pueden diseñar y crear distintos tipos de resinas líquidas fotopolimerizables y al trabajar en solución, se pueden incorporar diversas moléculas como fármacos y /o nanopartículas.⁶⁷

Gracias a todas las ventajas antes mencionadas, se llega a la hipótesis que las nanopartículas plasmónicas y la impresión en 3D generarán un efecto sinérgico entre sí, ya que combinan la alta precisión en el desarrollo de objetos tridimensionales, la personalización y la posibilidad de combinar e incorporar diferentes materiales en un dispositivo que nos ofrece la impresión en 3D con las propiedades ópticas y magnéticas de las nanopartículas plasmónicas.

De esta manera, se propone diseñar un dispositivo farmacéutico impreso en 3D mediante la técnica de SLA que contenga nanopartículas de oro con el objetivo que estas respondan frente a un estímulo y permitan controlar la cinética de liberación de un activo.

El fármaco modelo utilizado para el desarrollo del dispositivo propuesto es la niclosamida (Figura 6). La niclosamida es un fármaco derivado del ácido salicílico y que pertenece a clase II según el sistema de clasificación biofarmacéutico (SCB), debido a su baja solubilidad y alta permeabilidad.⁶⁸ Inicialmente se utilizó como antihelmíntico para el tratamiento de parásitos como la *Taenia Sp*. El mecanismo de acción del fármaco es mediante la inhibición de la fosforilación oxidativa en el parásito. Actualmente se ha reposicionado este fármaco y se ha estudiado su utilidad contra cáncer gástrico, de próstata, mama y también ha demostrado eficacia contra COVID y *Helicobacter pylori*.⁶⁹⁻⁷¹

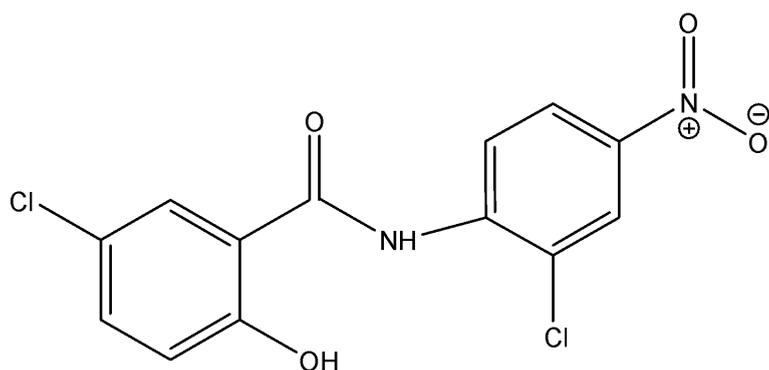


Figura 6 Estructura orgánica niclosamida

Hipótesis

El diseño y desarrollo de dispositivos impresos en 3D mediante estereolitografía que contienen nanopartículas de oro de diferente morfología y un fármaco modelo permitirá el control de la liberación del principio activo mediante la exposición del dispositivo a estímulos externos como la irradiación a diferentes longitudes de onda.

Objetivo general

Diseñar, desarrollar y caracterizar dispositivos impresos en 3D destinados a terapia fototérmica combinando la técnica de impresión estereolitografía con nanopartículas de oro de diferentes morfologías para la liberación controlada de niclosamida.

Objetivos específicos

- **Objetivo Específico 1:** Desarrollar materiales de impresión para SLA sensibles a la luz para terapia fototérmica.
- **Objetivo Específico 2:** Estudiar el efecto de la inclusión de nanosistemas de oro en un dispositivo sólido fabricado mediante impresión en 3D y evaluar su influencia en la liberación controlada del fármaco modelo niclosamida.

- **Objetivo Específico 3:** Generar un dispositivo bicapa que contenga dos tipos de nanopartículas y que sea capaz de responder a estímulos y liberar de manera controlada el fármaco modelo niclosamida.

Capítulo 2: Materiales y Métodos.

2.1 Materiales:

Niclosamida (NICLO) (Lote 0000122971), Polietilenglicol diacrilato 250 (PEGDA 250), polietilenglicol 575 (PEGDA 575), polietilenglicol 400 (PEG 400) y oxido de difenil (2,4,6-trimetilbencoil) fosfina (TPO) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Missouri, Estados unidos). Se utilizó agua Milli-Q ultrapura con una resistividad de 18,2 M Ω a 25°C, filtrada a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22 μ m, en el estudio. A menos que se especifique lo contrario, todos los demás productos químicos fueron de grado analítico.

2.2 Metodología

Esquema general de metodología:

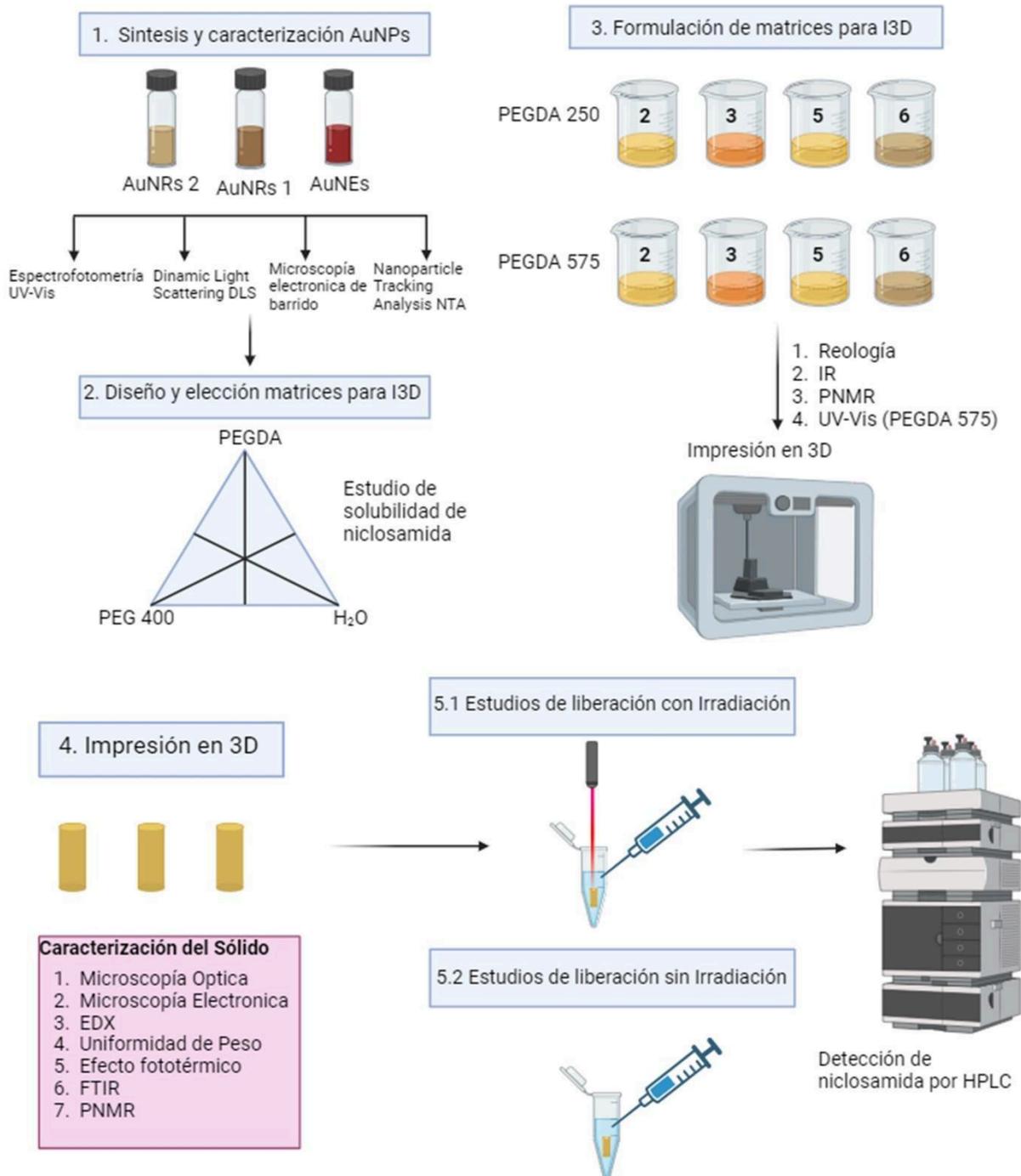


Figura 7 Esquema representativo de Metodología General

2.3 Síntesis de Nanopartículas de Oro

Los nanosistemas fueron sintetizados mediante el método de síntesis químico bottom up, que consiste en la nucleación y crecimiento de las nanopartículas, a partir de un precursor metálico y la posterior reducción de este a valencia 0.⁷²

Para la obtención de **Nanoesferas (AuNEs)**. Las AuNEs fueron preparadas por reducción con citrato. Una solución acuosa de HAuCl_4 fue llevada a reflujo y luego de 10 min se le agregó una solución acuosa de citrato de sodio 38,8 mM calentada entre 50 y 60°C. Se dejó el sistema a reflujo en un balón de fondo redondo durante 30 minutos exactos hasta la obtención de una solución roja oscura. Una vez obtenidas las AuNEs el pH se ajustó entre 7-8 utilizando una solución de NaOH diluido.^{12,73}

Los **nanobarras de Oro (AuNRs 2)** de 1064 nm se sintetizaron utilizando el método de crecimiento mediado por semillas modificado. La semilla se preparó mezclando 85 μL de una solución de HAuCl_4 (29,4 mM) con 4,915 ml de CTAB (0,1 M) como agente estabilizante y se agitó durante 5 min; luego se añadieron 300 μL de una solución fría de $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ (10 mM/0,01 M) para reducir el oro y se mantuvo en agitación durante 30 min. Posteriormente, la solución de crecimiento se preparó añadiendo 170 μL de solución de oro HAuCl_4 (29,4 mM) a 9,83 ml de CTAB. (0,1 M) y se agitó durante 10 min. Luego, se añadió 1 ml de AgNO_3 (10 mM) a la mezcla y se agitó durante 30 seg. Pasado el tiempo se agregaron 500 μL de hidroquinona (100 mM) y se dejó agitando hasta que cambió de color (de amarillo a incoloro). Finalmente, se extrajeron 160 μL de la semilla y se mezclaron con la solución de crecimiento, se dejaron reposar durante la noche.

La funcionalización de las AuNRs 2 se realizó mediante 2 centrifugaciones de 30 minutos a 12.500 rpm con el fin de remover el CTAB, posteriormente se resuspendieron en 10 mL de agua Milli- Q y se sometió a agitación constante, se agregó 100 μL de una solución de KOH 1M y posteriormente 700 μL de una solución de PEG-Ome al 0,1 M. Se dejó en agitación durante 1 hora y se centrifugó a 12.500 rpm por 1 hora, finalmente se resuspendieron en 10 mL de agua Milli-Q.²²

Las **nanobarras de primera ventana (AuNRs 1)** se sintetizaron utilizando el método de crecimiento mediado por semillas. La semilla se preparó mezclando 85 μL de una solución de HAuCl_4 (29,4 mM) con 4,915 ml de CTAB (0,1 M) como agente estabilizante y se agitó

durante 10 min; luego se añadieron 300 μL de una solución fría de $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ (10 mM/0,01 M) para reducir el oro y se mantuvo en agitación durante 30 min. Posteriormente, la solución de crecimiento se preparó añadiendo 170 μl de solución de oro HAuCl_4 (29,4 mM) a 9,83 ml de CTAB. (0,1 M) y se agitó durante 10 min. Luego, se añadió 75 μL de Ácido ascórbico (100 mM) a la mezcla y se agitó durante 30 seg. Pasado el tiempo se agregaron 80 μL de AgNO_3 (5 mM) y se dejó agitando por 30 segundos, luego se extrajeron 120 μL de la semilla y se mezclaron con la solución de crecimiento, se dejaron reposar durante 2 horas. Adicionalmente las AuNRs 1 se funcionalizaron agregando 100 μL de KOH (1M) y 50 μL de PEG-Ome (1mM), se agitó por 10 min y luego se centrifugó a 12600 rpm por 10 min. Se resuspendieron en 10 mL de agua Milli-Q y se añadió una solución de KOH 100 μL (1 M) en agitación por 30 segundos, posterior se agregaron 300 μL de PEG-COOH (1mM). Se sometió a una última centrifugación a 12600 rpm por 20 min y se resuspendieron en 10 mL de agua Milli-Q.²⁶

2.3 Espectrofotometría UV-Vis.

La resonancia de plasmón de las AuNEs y AuNRs se evaluó a través de espectroscopia UV, utilizando un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-DAD (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.) controlado por el software Chemstation v.B04-02. La configuración de medición incluyó una resolución de 1 nm y un rango de 190 a 1100 nm.

2.4 Determinación de diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad:

Los nanosistemas sintetizados se sometieron a caracterización de su diámetro hidrodinámico (tamaño) e índice de polidispersión (PDI) utilizando la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) con dispersión no invasiva, medida a un ángulo de 173° a través de un instrumento Zetasizer® Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Antes de las mediciones (realizadas en triplicado), las muestras se diluyeron en agua Milli-Q adecuadamente (1:100).

2.5 Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).

La concentración de las AuNEs y AuNRs se cuantificó mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) utilizando un sistema NanoSight NS300 (NanoSight, Amesbury, Reino Unido). Antes de la caracterización, se realizó una dilución de 1:100 utilizando agua Milli-Q.

2.6 STEM

Las muestras se sometieron a observación a través de microscopía electrónica utilizando un microscopio electrónico de transmisión de barrido, el FEI Inspect F50. Para lograrlo, se colocaron 20 μL de cada muestra en una rejilla de cobre con recubrimiento de Formvar/carbono durante 2 minutos. Luego, la rejilla se sometió a un doble enjuague con agua Milli-Q, cada uno durante un minuto, después de lo cual se secó cuidadosamente utilizando papel absorbente Whatman.

2.7 Diseño de matrices para Impresión en 3D

Para la fabricación de matrices poliméricas como materiales para impresión 3D a través de fotopolimerización en batea, se estudió la solubilidad del fármaco modelo niclosamida en mezclas ternarias. Las proporciones para preparar estas mezclas se obtuvieron utilizando el *software Design Expert*. El diseño experimental ternario fue un diseño de centro mixto. Se combinaron diferentes proporciones de un fotopolímero (PEGDA), un cosolvente (PEG 400) y agua, en la que se suspendieron los nanosistemas. Se realizaron combinaciones de solventes, lo que resultó en 13 matrices diferentes, y se evaluó la solubilidad del fármaco mediante espectroscopía UV-Vis. Las determinaciones se realizaron en triplicado.

2.8 Evaluación de solubilidad de niclosamida en matrices:

Los datos de solubilidad expuestos se obtuvieron mediante un ensayo de solubilidad en donde se dispusieron las 13 matrices diseñadas en tubos eppendorf de 1,5 mL y se agregó la cantidad de niclosamida suficiente para sobresaturar la solución, se dejó en agitación constante por 72 horas y posteriormente se centrifugaron y filtraron las muestras, se tomó el sobrenadante y se midió mediante espectrofotometría UV-Vis. Todo el ensayo se realizó a 25 °C.

2.9 Reología

Los análisis reológicos se realizaron a temperatura de 25 °C y presión atmosférica. Se utilizó el equipo HAAKE RheoStress 1, utilizando el sensor plato-plato PP35 Ti con una separación de 1 mm. Se prepararon las matrices 2, 3, 5 y 6 con PEGDA 250 y PEGDA 575 y se realizaron mediciones en triplicado de las 8 matrices totales. Adicionalmente se analizaron muestras control como el PEG 400 y el PEGDA 250 y PEGDA 575.

2.10 Proceso de Impresión en 3D

Los cilindros de 3x5 mm se diseñaron utilizando el software CAD Fusion 360 (Autodesk Inc., California, EE. UU.), y luego los archivos de impresión se generaron utilizando Chitubox (CTB SDK, Guangdong, China). Las impresiones se realizaron utilizando una impresora Anycubic Photon S (Anycubic, Shenzhen, China), y los objetos impresos se lavaron con agua Milli-Q y se curaron a 405 nm durante 1 minuto en un dispositivo Anycubic Wash and Cure (Anycubic, Shenzhen, China). Los parámetros de impresión utilizados para las matrices con PEGDA 250 y PEGDA 575 se muestran en la Tabla 1.

Para la impresión en 3D del dispositivo bicapa con PEGDA 575 se siguieron los mismos parámetros de impresión que para los dispositivos monocapa, se inició el proceso con una resina que contenía AuNRs 2 sin embargo, la impresión se detuvo a la mitad (capa 84) y se cambió la resina por una que contenía las AuNRs 1.

Tabla 1 Parámetros de impresión de matrices poliméricas fotopolimerizables.

Parámetro de Impresión	PEGDA 250	PEGDA 575
Capas totales	109	168
Tiempo de exposición (seg)	4	20
Tiempo de exposición de la primera capa (seg)	65	80
Distancia de elevación (mm)	5	5
Altura de capa (mm)	0,05	0,05
Velocidad de elevación (mm/min)	65	180
Velocidad de retracción (mm/min)	150	150

2.11 Microscopía Óptica

Las muestras se colocaron en una lámina de vidrio calibrada y se observaron bajo un microscopio óptico (modelo OLYMPUS BX-51) a una magnificación de 10x.

2.12 Espectroscopía infrarroja

Se utilizó un equipo FT-IR modelo iS50 de Thermo Scientific Nicolet para medidas de transmisión y reflectancia. Se tomaron alícuotas de las matrices 5 y 6 antes y después de someterlas al proceso de impresión y se caracterizaron por espectroscopía infrarroja.

Adicionalmente se sometieron los dispositivos sólidos a un proceso de congelamiento con nitrógeno líquido y posterior pulverización para poder caracterizarlos por FITR. A modo de control se analizó el TPO, PEG 400 y PEGDA 575.

2.13 Resonancia magnética nuclear de fósforo

Se obtuvieron los espectros de fósforo de transformadas de Fourier mediante la utilización del equipo de resonancia magnética nuclear BRUKER AVANCE-200 de la Pontificia Universidad Católica de Chile, el solvente utilizado para todas las muestras fue DMSO – d6. Mediante el software ORIGIN se obtuvieron las imágenes de los espectros de las matrices 5 y 6 antes y después de la impresión y de los sólidos pulverizados con nitrógeno líquido y solubilizados en DMSO d-6.

2.14 Uniformidad de Peso

Siguiendo las pautas indicadas en la USP (Farmacopea de los Estados Unidos, 2007), se evaluó la uniformidad de los pesos de las formas obtenidas. Para ello, fue necesario pesar diez impresiones de igual tamaño, calcular la masa promedio y verificar que no más de dos masas individuales se desviaran en más del 5% de la masa promedio. Se transportaron diez copias de cada matriz a la balanza analítica para determinar el peso de cada impresión. Estas impresiones se pesaron meticulosamente dentro de un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Antes del proceso de pesaje, la balanza se calibró utilizando el tubo Eppendorf vacío para asegurarse de que solo se registrará el peso de la impresión en sí misma.

2.15 Microscopía Electrónica de Barrido

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) (FEI Inspect 50-USA con un voltaje de aceleración de 3-20 kV) a magnificaciones entre 500x y 14,000x para analizar la morfología superficial y la estructura interna de las impresiones.

Para los estudios de análisis estructural de los dispositivos sólidos frente a diferentes estímulos se dispusieron 4 dispositivos sólidos, 2 con AuNRs 2 y 2 sin AuNRs, estos fueron sumergidos en un medio de PBS con Tween 80 al 1% por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C). 2 de estos dispositivos se sometieron a irradiación a 1084 nm durante estos 5 minutos

y se observó bajo el microscopio. El esquema de preparación de muestras se representa en la Figura 8.

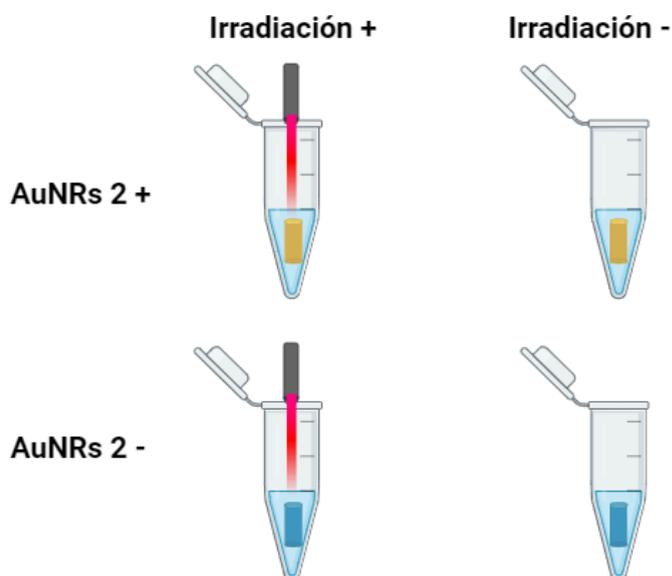


Figura 8 Esquema representativo de metodología de la preparación de muestras para ensayo de análisis estructural SEM.

2.16 Evaluación del efecto fototérmico:

Se utilizaron un láser de 532 nm (LDCU5/9020, Power Technology, Alexander, AR, EE. UU.), un láser de 1064 nm (IQ1A350, Laseray Inc., EE. UU.) y un láser de 808 nm (IQ1A350, Laseray Inc., EE. UU.) para irradiar las AuNEs y AuNRs2 y AuNRs1 en una cámara oscura cercana para evaluar el efecto fototérmico de las nanopartículas en los dispositivos impresos. La potencia del láser utilizada fue de 300 mW, 400 mW y 350 mW respectivamente. Las imágenes se capturaron con una cámara termográfica FLIR E8xt (FLIR Systems Inc, Washington DC, EE. UU.). Los objetos impresos con nanopartículas y las impresiones de control sin nanopartículas se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL con PBS. Posteriormente, se irradiaron durante 5 minutos, y se evaluaron los cambios de temperatura para determinar el efecto fototérmico de las nanopartículas en las impresiones 3D.

El dispositivo control en ambos casos fue la matriz 6 sin nanopartículas de oro. Para el control de las AuNEs se irradió el blanco con un láser de 532 nm, en el caso del control de las AuNRs2 se irradió el blanco con un láser de 1064 nm y para el control de las AuNRs 1 se irradió el blanco con un láser de 808 nm.

2.17 Evaluación de la Liberación sin Irradiación y el Equilibrio de Solubilidad en Fase por Espectrofotometría UV-Vis.

Los dispositivos impresos se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml con PBS y se sometieron a una agitación continua a 250 rpm en un termoagitador a 37 °C. Se tomó una muestra de 1 mL para su medición en el espectrofotómetro UV-Vis a los 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos y 4320 minutos (equivalente a 3 días). La muestra tomada para la medición se devolvía al mismo tubo para asegurar que la concentración de niclosamida liberada fuera acumulativa. Las determinaciones se realizaron en triplicado.

2.18 Evaluación de la Liberación mediante irradiación con láser por Espectrofotometría UV-Vis:

Los dispositivos se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se irradiaron durante 15 minutos utilizando un láser de 532 nm (LDCU5/9020, Power Technology, Alexander, AR, EE. UU.) o un láser de 1064 nm (IQ1A350, Laseray Inc., EE. UU.), y la liberación del fármaco modelo se registró midiendo la espectrofotometría UV-Vis a 333 nm cada minuto. Las determinaciones se realizaron en triplicado.

2.19 Análisis estadístico:

Cada resultado se expresó con su valor medio \pm error estándar (SD). Se utilizó el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, CA, EE. UU.) para el análisis estadístico. Se utilizó una prueba de análisis de varianza para la comparación/ análisis estadístico. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p igual o menor a 0,05.

2.20 Estudios de liberación con y sin irradiación por Cromatografía Líquida (HPLC)

La fase móvil utilizada fue preparada a partir de una solución de Fosfato dihidrógeno de potasio KH_2PO_4 al (0,01 M) y Acetonitrilo CH_3CN en proporción 60:40 v/v. Se utilizó una

columna Zorbax C189 (250 x 4,5, 5 μ m), las condiciones cromatográficas fueron el flujo a 1 ml/min, temperatura de la columna 30°C, pH=7, tiempo de retención 4.0 min, volumen de inyección 20 μ l y detector UV con DAD a 350 nm.⁷⁴

Inicialmente se realizó una curva de calibración. La solución estándar de niclosamida fue preparada pesando 5 mg de niclosamida y disolviéndose en 25 mL de una solución de PBS al 1 % / Tween 80 al 1%. Se realizaron diluciones en 8 puntos abarcando concentraciones en el rango de 1 a 25 mg/L. La solución estándar fue filtrada con un filtro de 0,22 μ m y se inyectaron 20 μ l al HPLC. Cada muestra se midió en triplicado.

Preparación de muestras para determinación por HPLC:

Para los estudios con irradiación se pesaron 7 dispositivos impresos y se dispusieron en tubos eppendorf de 1,5 mL. A cada uno se le agregó 1 mL de una solución de PBS/Tween 80 al 1%. Los dispositivos sumergidos se sometieron a tiempos de irradiación de 1, 2, 3, 5, 8, 13 y 15 minutos y se tomó el sobrenadante. Se filtró el sobrenadante con un filtro de 0.22 μ m y se inyectaron 20 μ l al HPLC. Cada muestra se midió en triplicado

Para los estudios de liberación sin irradiación se pesaron 5 dispositivos impresos y se dispusieron en tubos eppendorf de 1,5 mL. A cada uno se le agregó 1 mL de una solución de PBS/Tween 80 al 1%. Los dispositivos sumergidos se sometieron a agitación a 300 rpm por 30, 60, 90, 120 y 1440 minutos y se tomó el sobrenadante. Este se filtró y se inyectó en el equipo de HPLC. Cada muestra se cuantificó por triplicado.

Para los estudios de liberación del dispositivo bicapa, se pesaron 3 dispositivos y se dispusieron en tubos eppendorf de 1,5 mL. A cada uno se le agregó 1 mL de una solución PBS/Tween 80 1%. El sólido 1 se sometió a irradiación durante 15 minutos con un láser de 808 nm, el sólido 2 se sometió a 15 minutos con un láser de 808 nm y 15 minutos con el láser de 1064 nm. El sólido 3 no fue expuesto a irradiación y se tomó la muestra a los 30 min bajo agitación mecánica.

Ajuste a modelos cinéticos:

Se dispusieron los datos obtenidos de los estudios de liberación en el programa DDSolver para modelar y ajustar cinéticas de perfiles de liberación de fármacos.^{75,76}

Los modelos cinéticos probados fueron: Orden 0, Orden 1, Higuchi, Korsmeyer-peppas y Hixson-Crowell y sus ecuaciones respectivas se pueden ver en la Tabla 2.

Tabla 2 Ajustes cinéticos del programa *DDsolver*

Modelo cinético	Ecuación
Orden 0	$F=K_0 \times t$
Orden 1	$F=100 \times (1 - e^{-k_1 \times t})$
Higuchi	$F= K_h \times t^{0.5}$
Korsmeyer Peppas	$F= K_{kp} \times t^n$
Peppas- Sahlin	$F= K_1 \times t^m + K_2 \times t^{2m}$

Capítulo 3 Resultados y Discusión

Objetivo específico 1. Desarrollar materiales de impresión para SLA sensibles a la luz para terapia fototérmica.

Se propuso diseñar una matriz líquida para impresión en 3D que este compuesta por el polímero fotosensible PEGDA, un cosolvente PEG, nanopartículas de oro resuspendidas en agua Milli -Q, un fotoiniciador Difenil (2,4,6-trimetilbenzoil) óxido de fosfina (TPO) y el fármaco modelo niclosamida. Para poder alcanzar este objetivo se tuvieron que obtener los componentes necesarios. Es por esto que, inicialmente se sintetizaron nanosistemas de oro de diferentes morfologías y por ende con distintos plasmones superficiales. Los nanosistemas probados fueron: Nanoesferas (AuNEs) y Nanobarras (AuNRs) de dos diferentes relaciones aspecto, de segunda ventana (AuNRs 2) de relación aspecto 5,9 y de primera ventana (AuNRs 1) de relación aspecto 2,9.

Caracterización por UV-Vis:

En la Figura 9.a) se puede observar el plasmón característico de las nanoesferas (AuNEs) a 532 nm. En la Figura 9.b) el plasmón característico de las nanobarras de segunda ventana (AuNRs 2) a 1086 nm en donde, también se puede observar un plasmón cercano a 530 nm que corresponde principalmente al plasmón transversal de las AuNRs. En la Figura 9.c) el plasmón característico de las nanobarras de primera ventana (AuNRs 1) a 774 nm, al igual que en las AuNRs 2 el plasmón transversal a 530 nm.

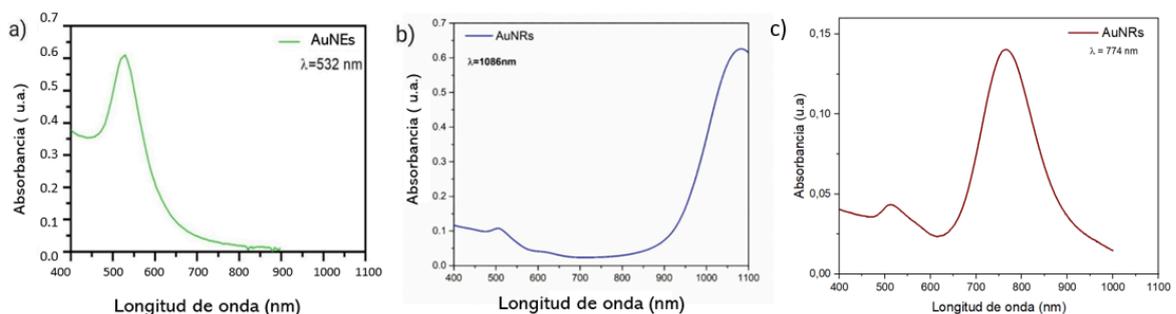


Figura 9 : Caracterización por espectrofotometría UV-Vis de las nanopartículas de oro dependiente de su morfología a) AuNEs b) AuNRs c) AuNRs 1.

En la Tabla 3 se pueden observar los datos correspondientes a la caracterización de los nanosistemas mediante potencial Z y diámetro hidrodinámico. De esta manera se obtuvieron parámetros de estabilidad coloidal, considerando estable aquellos valores de potencial Z cercanos a ± 30 mV ⁷⁷. De esta manera, las partículas tendrán una fuerza de repulsión electrostática suficiente para no aglomerarse y desestabilizar la suspensión coloidal. Además, la medición del diámetro hidrodinámico nos entrega un estimativo del tamaño de partícula. Sin embargo, estos valores se verán afectados por la anisotropía de cada nanosistema y por el sistema de medición del equipo que se basa en el movimiento browniano de las partículas en suspensión. En el caso de la AuNEs, el potencial Z fue de -48 mV, esto implica una buena estabilidad coloidal, el valor del potencial es negativo debido a la carga del citrato de sodio utilizado en la síntesis de las AuNEs. Adicionalmente el diámetro hidrodinámico arrojó un valor de 27 nm. Si bien el valor esperado según el protocolo de síntesis es cercano a 30 nm, la medición de este parámetro cuenta con el valor añadido de la esfera de solvatación por lo que es esperable un leve aumento en el valor de la medición del diámetro hidrodinámico.

Para las AuNRs 2 sin pegilar, el potencial Z arrojó un valor de +32 mV, evidenciando una estabilidad coloidal deseada, este valor es positivo debido al estabilizante CTAB utilizado en su síntesis ya que posee un grupo amonio en su estructura que le entrega una carga positiva. Adicionalmente este agente puede ser tóxico para las células debido a su capacidad surfactante y al grupo amonio, lo que lo hace ser altamente reactivo con componentes orgánicos, es por esta razón que se eliminará el CTAB mediante la funcionalización con HS-PEG-O-me para todas las nanobarras que involucren CTAB en su síntesis. Por otro lado, el diámetro hidrodinámico transversal dio un valor de 4 nm y el longitudinal de 60 nm, sin embargo, al ser estructuras anisotrópicas los valores obtenidos son estimados a partir de la aproximación de que las partículas son esféricas (según ajustes realizados por el software del equipo) por lo que es más fidedigno considerar los valores obtenidos por microscopía electrónica.

Para los AuNRs 2 PEG-Ome el valor del potencial Z disminuyó a -20 mV indicando que se logró remover el CTAB de la superficie. Adicionalmente los valores de diámetro hidrodinámico aumentaron según lo esperado tras la funcionalización de la superficie de las nanopartículas.

Para las AuNRs 1 en CTAB se obtuvo un valor de potencial Z positivo, debido a las cargas del estabilizante, cuando se funcionalizaron con PEG-Ome el valor de potencial Z disminuyó

a -33 mV esto es concordante a la presencia de los grupos metoxilos. Adicionalmente se funcionalizaron con HS-PEG-COOH, esto debido a que estas nanopartículas presentaban inestabilidad coloidal al cabo de unos días cuando fueron funcionalizadas solo con PEG-Ome. El potencial Z se mantuvo negativo, esto debido a las cargas del carboxílico y se mantuvieron estables en el tiempo y en las matrices. Los valores de diámetro hidrodinámico están sobre lo esperado según la síntesis, pero al igual que para las AuNRs 2 estos valores se verán afectados por la morfología anisotrópica de estos nanosistemas.

Tabla 3 : *Caracterización AuNEs, AuNRs por potencial Z y Diámetro hidrodinámico. Medición en quintuplicado de 1 lote*

Nanosistema	Potencial Z (mV)	Diámetro hidrodinámico (nm)	Dh. Transversal (nm)	Dh. Longitudinal (nm)	PDI
AuNEs	-48± 3	27 ± 1.2	-	-	0.24
AuNRs 2 CTAB	32.0 ± 0.3	-	4.0 ± 0.5	60 ± 16	0,47
AuNRs 2 -PEG- Ome	-21± 6	-	17± 9	208 ± 129	0.30
AuNRs 1 CTAB	24± 13	-	6,7 ± 1,8	74,76 ± 53	0,65
AuNRs 1 PEG-Ome	-20 ± 7	-	1,6 ± 0,5	59 ± 35	0,63
AuNRs 1 PEG-COOH	-35 ± 9	-	3.0 ± 0,9	69 ± 38	0,64

Adicionalmente los nanosistemas fueron caracterizados por NTA con el fin de obtener parámetros de concentración y tamaño de partícula como se muestra en la Figura 10 en donde se observó un diámetro promedio de 35 nm para las AuNEs, de 53 nm para las AuNRs1 PEG-COOH y de 70 nm para las AuNRs 2 PEG-Ome.

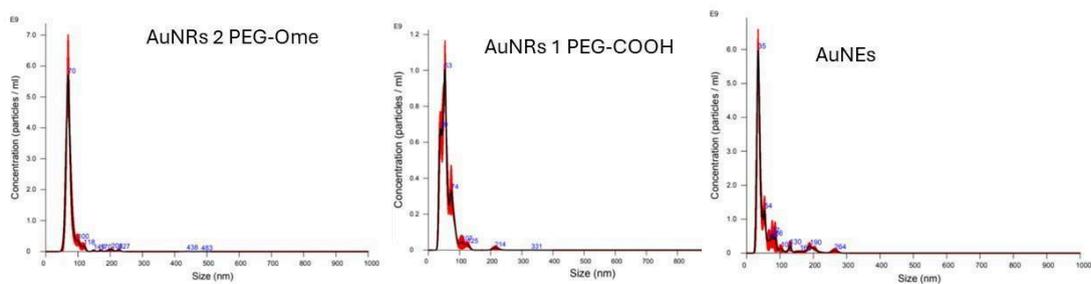


Figura 10 Análisis de seguimiento de nanopartículas NTA.

En la Figura 11. Se pueden observar las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de los 3 nanosistemas sintetizados junto con sus histogramas de distribución de tamaño y aspecto en el caso de las AuNRs. En la Figura 11 a) y d) se observan las AuNEs por microscopía electrónica en donde se obtuvo un valor promedio de 22 nm de diámetro según los histogramas de tamaño. En la Figura 11 b) y e) se observan las AuNRs 2 obtenidas con un diámetro de 70 y 80 nm y una relación aspecto de 5,9. En la figura 11. c) y f) Las AuNRs 1 con un diámetro longitudinal promedio entre 32 y 34 nm y una relación aspecto de 2,9.

Esto demuestra, en conjunto con las demás caracterizaciones ya mencionadas, que se sintetizaron los nanosistemas de manera exitosa que absorben energía dentro de las longitudes de onda deseadas.

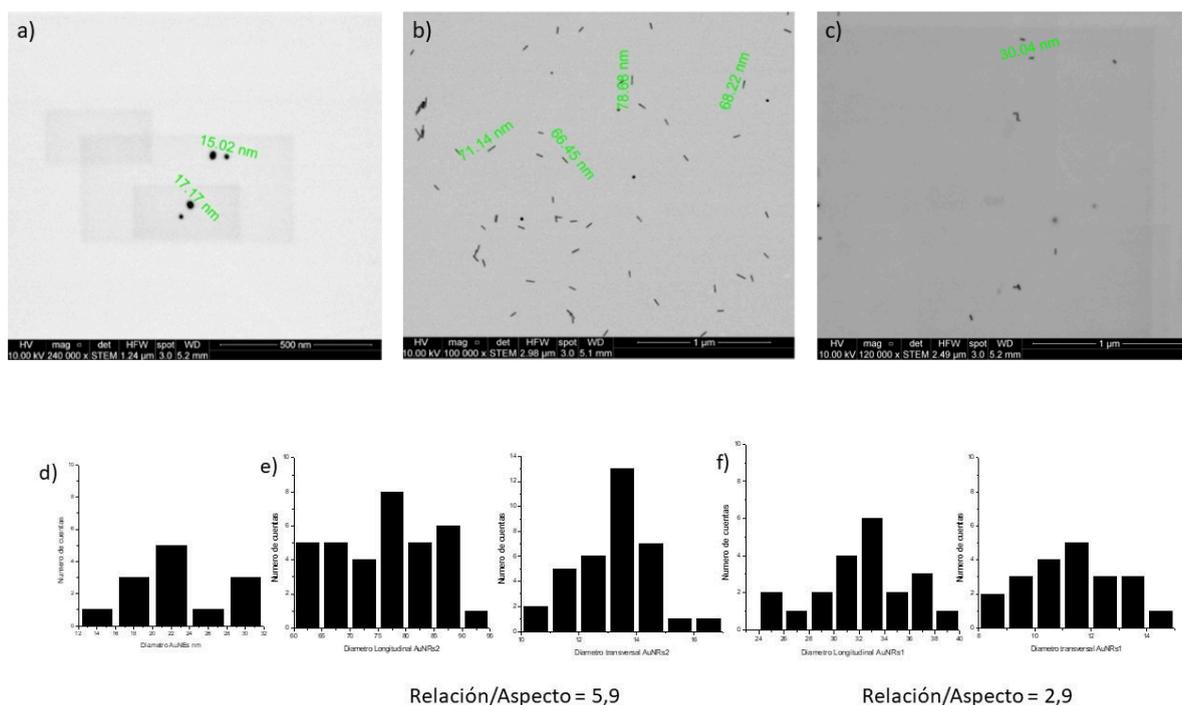


Figura 11. a) Caracterización AuNEs por STEM b) Caracterización AuNRs 2 por STEM c) Caracterización AuNRs 1 por STEM. d) Histogramas de distribución de tamaño AuNEs e) Distribución longitudinal y transversal AuNRs f) Distribución longitudinal y transversal AuNRs1

Posterior a la obtención y caracterización de los nanosistemas se procedió a diseñar la formulación de los otros componentes de las matrices poliméricas para impresión en 3D, proponiendo distintas proporciones de PEGDA, PEG y agua (en donde se resuspendieron los nanosistemas).

Utilizando un tipo de diseño centrado mixto y mediante el *software Desing expert*, se obtuvieron 13 mezclas ternarias compuestas de PEGDA, PEG y Agua. De esta manera se propuso estudiar la solubilidad del fármaco modelo niclosamida en cada una de las matrices propuestas. Los datos de solubilidad expuestos, así como las proporciones de las mezclas se exponen en la Tabla 4. El polímero fotosensible PEGDA es el responsable del grado de entrecruzamiento de los monómeros a la hora de solidificar la resina líquida, por lo que va a determinar el comportamiento fisicoquímico y reológico de la matriz líquida y las condiciones finales de los impresos sólidos. Es por esto que, en este estudio se incluyen dos PEGDA de diferente peso molecular 250 y 575, con el fin de seleccionar aquel que permita la

liberación controlada de niclosamida y consiga una impresión exitosa con parámetros de printabilidad esperados.

La proporción de agua en las matrices ternarias es en donde se incorporaron los nanosistemas, por lo que en todas las matrices existirá al menos un 10 % de concentración de este componente.

La concentración de nanosistemas será una constante en todas las matrices y el valor dependerá de la concentración final obtenida de la síntesis y la concentración necesaria para generar fototermia. A continuación, la Tabla 5 resume las concentraciones de cada nanosistema obtenidas al final de la síntesis y pegilación en el caso de las AuNRs por NTA.

Tabla 5 Concentración de nanopartículas utilizadas obtenidas por NTA.

Nanosistema	Concentración
AuNEs	176 pM
AuNRs 2	26,7 pM
AuNRs 1	48,65 pM

Tabla 4 Proporciones de la composición de las matrices formuladas por el software Design expert y la solubilidad de niclosamida en cada una de ellas.

N° de matriz	PEGDA %	PEG 400 %	H ₂ O %	Solubilidad niclosamida µg/ mL PEGDA 250	Solubilidad niclosamida µg/mL PEGDA 575	Matrices candidatas a impresión en 3D
1	20	35	45	54,40	294,58	
2	20	70	10	11778,6	2804,13	x
3	31,67	46,67	21,67	4773,27	1845,79	x

4	55	0	45	218,417	190,25	
5	55	35	10	53070,75	2565,81	x
6	90	0	10	4069,54	5556,04	x
7	66,67	11,67	21,67	57,6347	2727,12	
8	20	0	80	142,722	12,83	
9	20	0	80	13,1332	14,10	
10	90	0	10	3974,75	3990,61	
11	43,33	23,33	33,33	56,1352	759,87	
12	31,67	11,67	56,67	16,0521	46,91	
13	20	70	10	13385,8	3695,39	

Se dispusieron los datos de solubilidad en el *software Design Expert* y se obtuvo un gráfico de superficie respuesta como se observa en la Figura 12. En donde la mayor solubilidad del activo se representa en las zonas con colores anaranjados.

En el caso de las matrices formuladas con PEGDA 575, se observaron porcentajes de solubilidad de niclosamida más elevados con el aumento gradual del contenido de PEGDA, siendo la matriz 6 la que presentó una mayor solubilidad de niclosamida. Por otro lado, en el caso del PEGDA 250, se evidenció que la niclosamida exhibía una mayor solubilidad en las matrices con un mayor porcentaje de PEG 400. Esta diferencia podría atribuirse al peso molecular del polímero PEGDA y la exposición de grupos acrilatos que afectarán a las características fisicoquímicas de la matriz final. En todos los casos los valores de solubilidad de niclosamida en las matrices poliméricas fue mayor que la solubilidad de niclosamida en agua $8 \mu\text{g} / \text{ml}$ ⁷⁸. Este aumento de la solubilidad de niclosamida en presencia de polímeros como el PEGDA concuerda con literatura en donde se estudió el aumento de la solubilidad de niclosamida en presencia de polímeros hidrofílicos como la hidroxipropilmetil celulosa HPMC ⁷⁹.

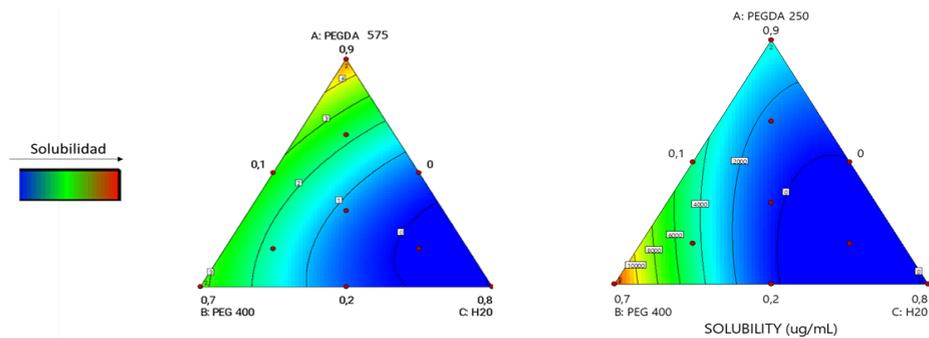


Figura 12 Gráfico de superficie respuesta de la solubilidad de niclosamida en 13 matrices con PEGDA 575 y 13 matrices con PEGDA 250

Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo cuadrático. Para el PEGDA 575, el análisis de ANOVA arrojó un valor F de 25,23 lo que implica que el modelo se ajusta y es significativo, el valor de p-value <0,0002 lo que indica que los términos del modelo son significativos. Para el PEGDA 250, el análisis de ANOVA arrojó un valor F de 61,8 y un p-value <0,0001. El experimento de solubilidad al igual que las mediciones se realizaron en triplicado.

Una vez obtenidos los valores de solubilidad de la niclosamida en las diferentes matrices propuestas, se seleccionaron aquellas capaces de solubilizar la mayor cantidad de niclosamida para ser candidatas a la impresión en 3D. Las matrices seleccionadas tanto para los diseños con PEGDA 250 y con PEGDA 575 fueron las matrices 2,3,5 y 6.

Objetivo específico 2: Estudiar el efecto de la inclusión de nanosistemas de oro en un dispositivo sólido fabricado mediante impresión en 3D y evaluar su influencia en la liberación controlada de un fármaco modelo niclosamida.

Este objetivo se separará en dos subcapítulos dependiendo del peso molecular del polímero utilizado: PEGDA 250 y PEGDA 575.

Subcapítulo 1: Para el PEGDA 250 se realizaron estudios preliminares con la inclusión de AuNEs, en este capítulo se observará el proceso desde la formulación de las matrices candidatas a impresión en 3D hasta la obtención de dispositivos sólidos y semisólidos que fueron sometidos a estudios de liberación.

Subcapítulo 2: Para el PEGDA 575 se estudió la inclusión de AuNRs de diferentes razones y diferentes plasmones superficiales en matrices líquidas para impresión en 3D. En este caso, al igual que en el PEGDA 250 se observará el proceso desde la formulación de las matrices hasta la obtención de los sólidos, sin embargo, para este polímero se realizaron caracterizaciones adicionales tanto a las muestras líquidas y sólidas.

SUBCAPÍTULO 1: PEGDA 250

Estabilidad de las matrices

Se decidió comenzar con las matrices con PEGDA 250 bajo la hipótesis de que al tener más acrilatos disponibles se generará una matriz con alto grado de entrecruzamiento, permitiendo así una baja liberación de niclosamida desde el dispositivo sin irradiar.

En la Figura 13 se puede visualizar el resultado final de la formulación de las 4 matrices escogidas. Para la matriz 6, al momento de incorporar las AuNEs estas demostraron una inestabilidad coloidal formando agregados de nanopartículas y demostraron una distribución no homogénea observable a simple vista, separándose las fases dentro de la matriz. Esto se puede deber a que la fracción de grupos acrilatos en el polímero aumenta al ser de un bajo peso molecular, dando origen a una resina menos hidrofílica^{80,81}. A pesar de esto, se mantuvieron en agitación constante durante 24 horas en donde se pudo observar una homogeneización parcial de las fases, por lo que se decidió llevar a cabo el proceso de impresión.

En las matrices 2, 3 y 5 no se produjo este fenómeno de separación de fases, dando origen a matrices líquidas, amarillas y translúcidas,

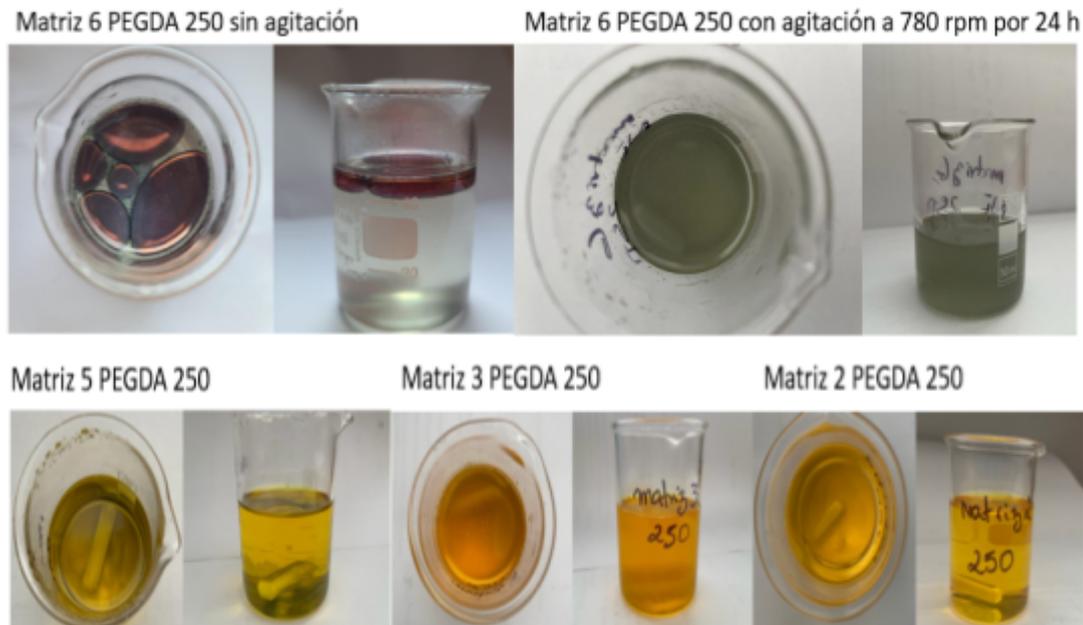


Figura 13 Imágenes de las matrices 2, 3, 5 y 6 posterior a la incorporación de todos los componentes que conforman la matriz.

Reología: matrices PEGDA 250

Con el fin de estudiar el comportamiento viscoelástico de las matrices, se realizó un estudio de reología para las matrices 2, 3, 5 y 6 formuladas con PEGDA 250. Adicionalmente se estudió la reología del PEG 400 y PEGDA 250 por sí solos, a modo de control.

En la Figura 14.a) Se puede observar la viscosidad de las matrices en función de la velocidad de corte. Para todas las matrices, la viscosidad se mantuvo constante a diferentes velocidades de corte, es decir, la resistencia de las matrices a fluir se mantiene a medida que aumenta la velocidad a la que se le aplica la fuerza

En la Figura 14.b). Se puede observar que, para todas las matrices, incluyendo el PEG 400 y PEGDA 250, la fuerza de corte aumenta linealmente con la velocidad de corte por lo que se puede determinar que tienen un comportamiento newtoniano, esto significa que la viscosidad del fluido es constante y no depende de la velocidad de corte. Matemáticamente se expresa como:

$$\text{Fuerza de corte (Pa)} = \text{Viscosidad (Pa x S)} \times \text{Velocidad de corte (1/s)}^{82}$$

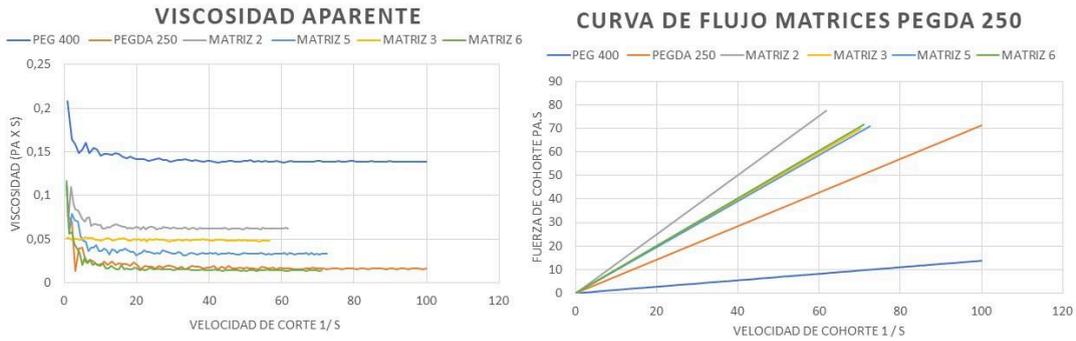


Figura 14 a) Viscosidad versus velocidad de corte PEG 400, PEGDA 250, matrices 2, 3, 5 y 6 b) Curva de flujo, fuerza de corte versus velocidad de corte. Para PEG 400, PEGDA 250, matrices 2, 3, 5 y 6

Impresión en 3D

Se propuso imprimir las matrices 2, 3, 5 y 6 con PEGDA 250 y AuNEs. El diseño esperado para la impresión fueron cilindros de proporciones de 2.5 x 4 mm.

Se envió el archivo digital a la impresora Anycubic Photon S y se empezó el proceso de impresión, el cual duró aproximadamente 20 minutos.

Los dispositivos obtenidos tras la impresión fueron caracterizados mediante microscopía óptica, uniformidad de peso y STEM.

Las matrices 2, 3, 5 y 6 que contenían AuNEs dieron origen a los sólidos presentes en la Figura 15 obtenida por microscopía óptica. En las matrices 5 y 6 se puede apreciar un menor paso de la luz, lo que podría indicar un mayor grado de entrecruzamiento del polímero, esto se puede deber a las concentraciones crecientes de PEGDA 250.

Los sólidos obtenidos no cumplieron con las dimensiones esperadas, sin embargo, se utilizaron con el fin de encontrar la región de trabajo en donde las proporciones utilizadas de los componentes de las matrices permitieran una correcta impresión.

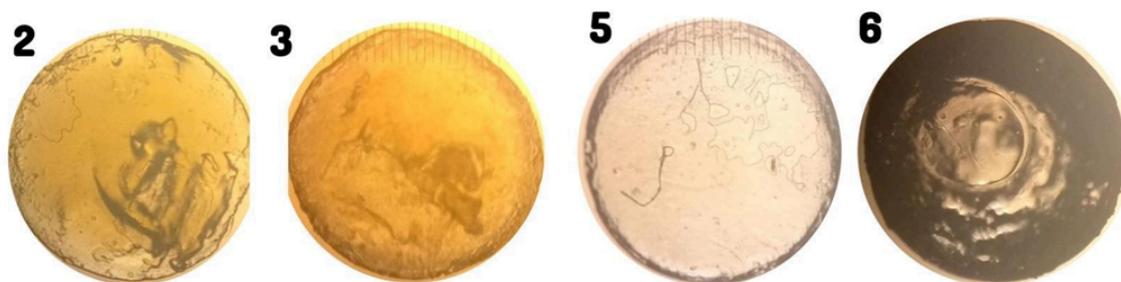


Figura 15 Imágenes obtenidas por microscopía óptica de los impresos resultantes de las matrices 2, 3, 5 y 6 con PEGDA 250.

Estudios de uniformidad de Peso:

Se estudió la uniformidad de peso de los dispositivos impresos con el fin de obtener un parámetro de calidad de impresión, de esta manera se evaluó la precisión de la impresión y la capacidad de las matrices de ser imprimibles. Adicionalmente se estimó la cantidad de fármaco que contiene cada impreso según el peso de este y la cantidad inicial de niclosamida disuelta en la matriz.

Para la uniformidad de peso se pesaron 10 impresos en una balanza analítica y se calculó su peso promedio y desviación estándar. Los datos obtenidos se pueden observar en la Tabla 6.

Para la matriz 2 con AuNEs el peso promedio fue de $1,97 \pm 0,34$ mg, esto indica que la calidad de impresión de esta matriz fue desfavorable, ya que se obtuvieron impresos semisólidos que no cumplieron con las dimensiones físicas esperadas. Sin embargo, la desviación estándar entre las 10 muestras fue menor que 0.4, por ello se considera que, aunque la impresión no se llevó a finalización según lo esperado, los dispositivos impresos fueron concordantes entre sí, es decir la impresión no fue exacta pero sí precisa. Además, cabe destacar que la cantidad de niclosamida estimada si bien es de 0,019 mg, este estimativo puede no ser exacto debido a las irregularidades de la impresión.

Al igual que en la matriz 2, la matriz 3 y 5 fueron impresiones en donde los dispositivos quedaron retenidos en el fondo del tanque y no en la cama de impresión, presentando irregularidades en el proceso.

Por otro lado, para la matriz 6 el peso promedio fue de 14.97 mg con una desviación estándar de 0.1. En esta ocasión solo algunos de los dispositivos quedaron retenidos en el tanque y otros lograron quedar sujetos a la cama de impresión. De esto se concluye que la matriz 6,

que es la que posee una mayor cantidad de PEGDA 250 es la matriz que tiene un mayor potencial para impresión en 3D mediante SLA.

Tabla 6 *Peso promedio y desviación estándar de 10 dispositivos sólidos impresos por cada matriz. Estimación de cantidad de niclosamida por dispositivo*

Matriz	Peso promedio mg	Desviación estándar	Cantidad de niclosamida por dispositivo mg.
2	1,97	0,34	0,019
3	2,053	0,29	0,0094
5	1,67	0,33	0,0071
6	14,97	0,11	0,05

Los dispositivos obtenidos tras la impresión de la matriz 6 con AuNEs se caracterizaron mediante microscopía electrónica como se puede observar en la Figura 16. No se aprecian nanopartículas en la superficie, tampoco se observan cristales de niclosamida, esto podría indicar que la molécula está disuelta en la matriz y no cristalizó durante el proceso de impresión, sin embargo, esto debe verificarse por técnicas más precisas como DRx.

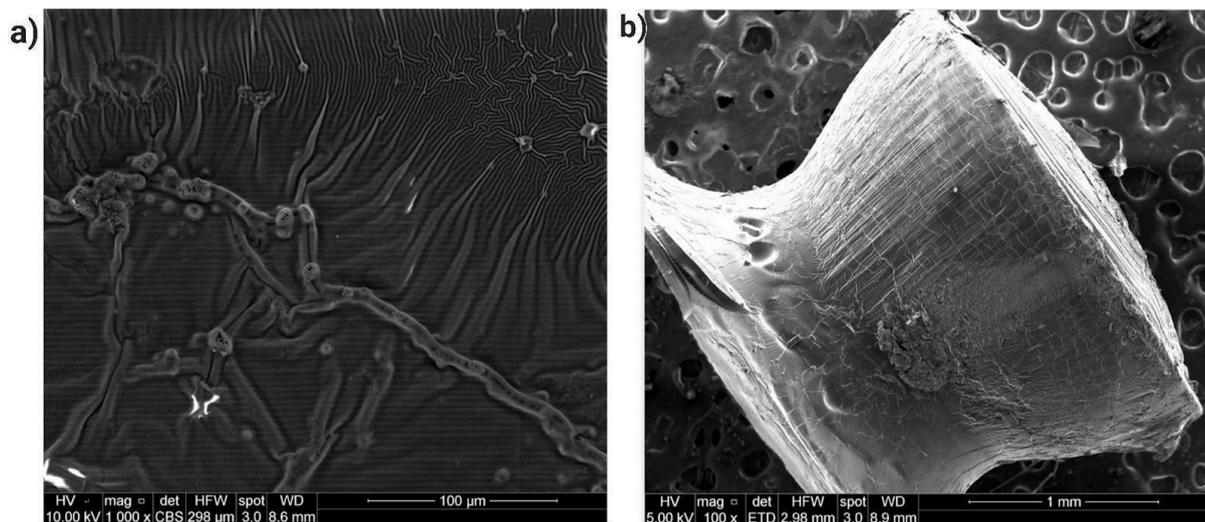


Figura 16 *a) Caracterización de impresos con AuNEs de la matriz 6 mediante SEM de manera superficial. b) Caracterización SEM de manera lateral.*

Efecto fototérmico:

Con el fin de evaluar la inclusión de las nanopartículas en los impresos se evaluó el efecto fototérmico mediante la irradiación con láser de 536 nm para los impresos que contienen AuNEs. En la Figura 17 se aprecia el efecto fototérmico para el impreso de la matriz 6 con AuNEs. En este se observa un aumento de la temperatura desde 25°C hasta 30°C tras 5 minutos de irradiación con el láser de 536 nm. Que el dispositivo haya aumentado la temperatura en aproximadamente 5°C tras la irradiación podría indicar que, a pesar de que las nanopartículas inicialmente demostraron ser inestables en la matriz, estas en parte, se incorporaron a la matriz y que la concentración utilizada de éstas fue la suficiente para producir un efecto fototérmico.

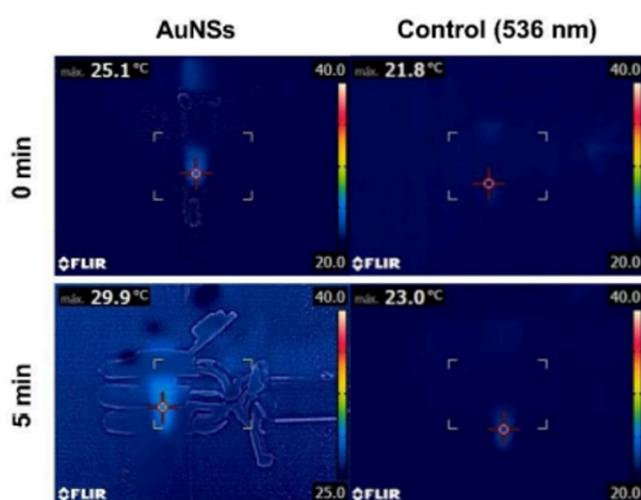


Figura 17 Efecto fototérmico de dispositivos sólidos de matriz 6 con AuNEs y control. A temperatura inicial del dispositivo y temperatura tras 5 min de irradiación.

Estudios de liberación:

Se realizaron estudios de liberación de niclosamida desde los dispositivos obtenidos tras la impresión de las matrices 2, 3,5 y 6 con PEGDA 250. Para esto se determinó la liberación de niclosamida mediante espectrofotometría UV-vis. Se realizó una curva de calibración en acetonitrilo como se puede observar en la Figura 18, esto con fin de poder interpolar los datos obtenidos en los estudios de liberación y relacionarlos con la concentración.

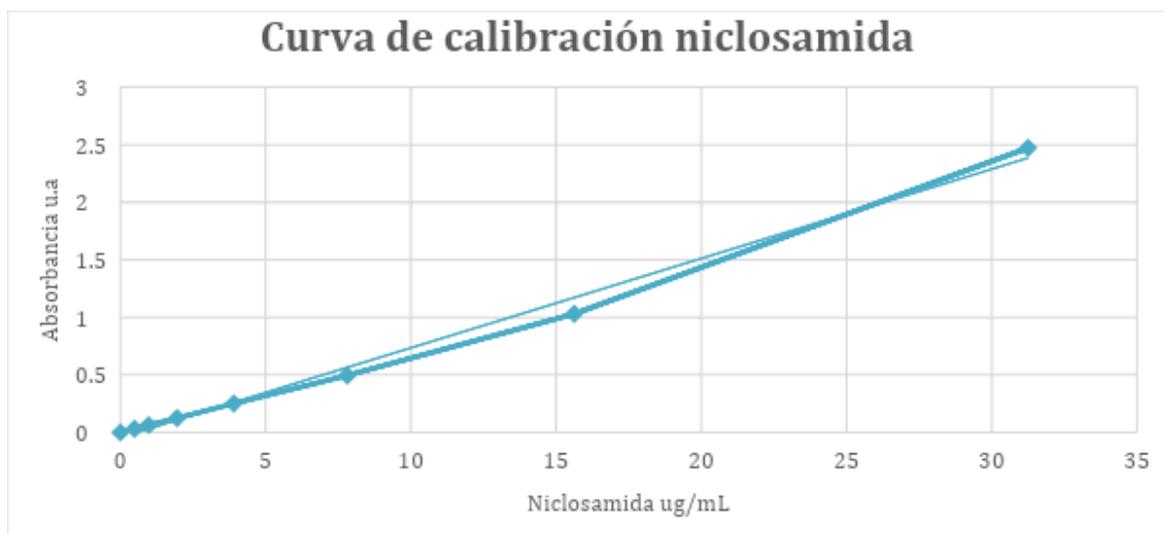


Figura 18 Curva de calibración de niclosamida en acetonitrilo mediante Espectrofotometría UV-Vis.

Estudios de liberación de niclosamida sin irradiación

Se dispusieron los dispositivos sólidos en tubos eppendorf suspendidos en PBS para la matriz 2, 3, 5 y 6. Se mantuvieron condiciones constantes de agitación y temperatura y se fueron recolectando alícuotas a los 30 min, 60 min, 90 min, 120 min y 3 días. Se midió la concentración de niclosamida en las alícuotas mediante espectrofotometría UV-Vis.

En la Figura 19 se puede observar un pico de liberación de niclosamida después de los 30 min de agitación alcanzando una concentración cercana al 2%. Posterior a este tiempo, la concentración decae indicando que disminuye la liberación. En todos los casos, se puede decir que existe una pobre liberación de niclosamida desde el dispositivo sólido sin irradiar. El porcentaje de liberación por bajo del 2% se podría atribuir a una liberación por difusión inducida por hidratación cuando el dispositivo se encuentra sumergido en un medio acuoso.

Para las matrices 2, 3 y 5, se observó que se lograron mayores tasas de liberación en comparación con la matriz 6 sin irradiar. Esta variación podría atribuirse a la diferencia en la cantidad de PEGDA y a la presencia del cosolvente PEG 400 en las composiciones de las matrices líquidas. Aquellas matrices con una mayor proporción de PEG 400, formarán redes con un grado de reticulación menor, lo que facilitará la difusión del fármaco desde la matriz.

Liberación niclosamida sin irradiación PEGDA 250

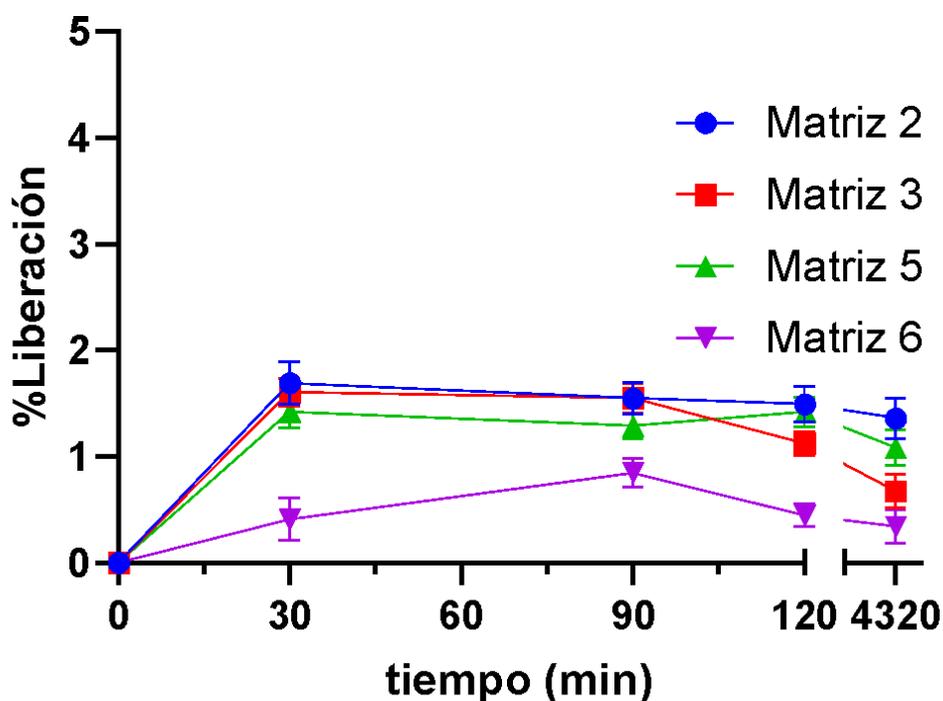


Figura 19. Perfiles de liberación de niclosamida desde dispositivos sólidos impresos en 3D de la matriz 2, 3, 5 y 6 sin irradiación, suspendidas en un medio de PBS al 1 % a 25 °C.

Estudios de liberación de niclosamida con irradiación.

Se evaluó la concentración de niclosamida liberada en función del tiempo tras la irradiación de 3 dispositivos impresos suspendidos en 1,5 mL de PBS y se tomaron muestras cada 1 minuto de irradiación hasta los 15 minutos. Las alícuotas recolectadas fueron medidas por espectrofotometría UV-Vis.

En la Figura 20 se observa la liberación de niclosamida tras la irradiación con láser de 532 nm a 50 mW de potencia. Los resultados arrojan un rápido aumento de la liberación de niclosamida desde el dispositivo tras los primeros minutos de irradiación hasta alcanzar un peak a los 10 min, luego de esto va decayendo la concentración hasta el minuto 15. Esto podría indicar que el dispositivo es capaz de responder al estímulo de la irradiación, liberando niclosamida desde el impreso.

Para poder estudiar el mecanismo de liberación se ajustaron los datos obtenidos de % de liberación versus el tiempo de irradiación mediante el programa DDSolver. El mecanismo cinético de liberación que más se ajustaron los datos obtenidos fue el de Korsmeyer-Peppas^{75,83} como se puede observar en la Tabla 7.

En la ecuación de Korsmeyer-Peppas donde se relaciona la cantidad de fármaco liberado en función del tiempo para sistemas de liberación a partir de formulaciones poliméricas⁷⁶ :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

M_t es el valor del fármaco liberado versus M_∞ que es el valor total del fármaco contenido en la matriz. De esta manera se puede obtener el porcentaje de liberación.

El valor de “k” es una constante asociada a las características estructurales y geométricas de la forma de dosificación.

El valor de “n” está relacionado al mecanismo de liberación del fármaco de tal forma que para formas cilíndricas:

$n < 0.45$ Indica una difusión Fickiana

$n = (0.45 - 0.80)$ Difusión anómala no Fickiana

$n = 0.80$ Indica difusión de clase II

$n > 0.80$ Indica difusión no Fickiana conocido como transporte Super caso II

Para el caso de la matriz 6 con AuNEs, el valor de n ajustado a la ecuación es igual a 0,27 lo que indica que el mecanismo de liberación podría seguir la ley de difusión de Fick. Esto implica que las moléculas de fármaco migran desde una zona de alta concentración a una zona de baja concentración siguiendo un modelo de difusión simple.

Liberación con irradiación AuNEs

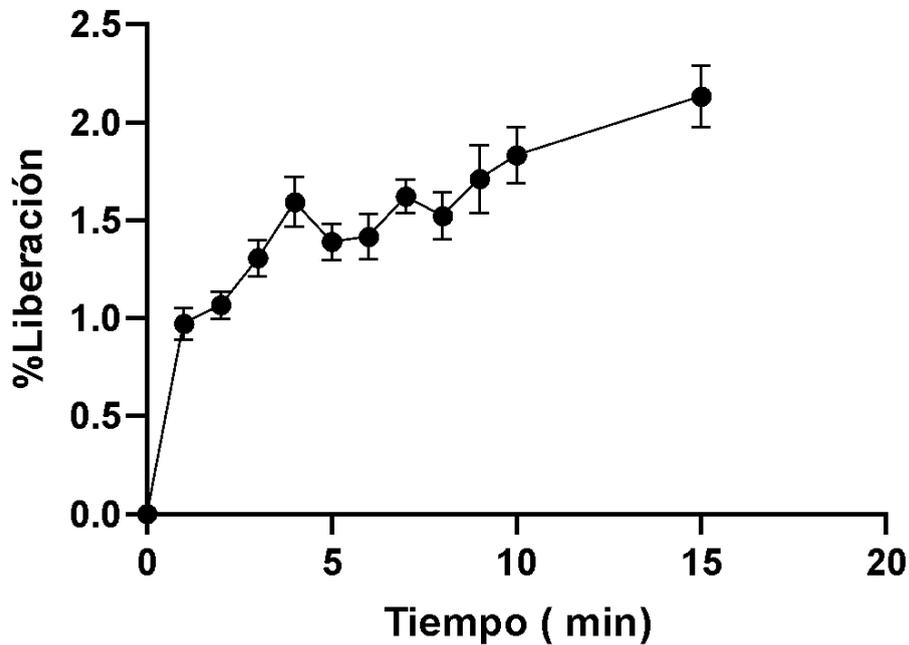


Figura 20 Perfil de liberación de niclosamida desde dispositivos sólidos obtenidos de la matriz 6 con AuNEs y PEGDA 250.

Tabla 7 Tabla de ajustes a modelos matemáticos, datos procesados por DDSolver.

AJUSTE CINÉTICO	R ²
ORDEN CERO	R= 0,00284
ORDEN UNO	R= 0,01271
HIGUCHI	R= 0,84361
KORSMEYER-PEPPAS	R= 0,96184
	n = 0,27587
	k = 0,94132
PEPPAS-SAHLIN	R= 0,9484 m= 0,45 k= 0,918

A partir de los datos obtenidos se puede concluir que la incorporación de AuNEs en los sólidos que fueron sometidos a irradiación a 532 nm permitió alcanzar mayores porcentajes

de liberación de niclosamida en menor tiempo que los dispositivos sin irradiar. Adicionalmente los datos obtenidos de la liberación con irradiación de los dispositivos de la matriz 6 con AuNEs, se ajustaron a un modelo cinético de Korsmeyer -Peppas indicando que el mecanismo de liberación de niclosamida es por Difusión Fickiana con un valor de $n = 0,27$. Esto concuerda con los modelos cinéticos reportados en literatura en donde se estudió la liberación de albúmina sérica bovina (BSA) por 50 horas a partir de un hidrogel de PEGDA-PEI (copolímero) y se determinó que la liberación de BSA inicial está gobernada por el hinchamiento del hidrogel, este mecanismo de liberación contempla la contribución por difusión Fickiana y por relajamiento de las cadenas del polímero.⁸¹

Efecto matriz

Con el fin de poder estudiar el efecto de los demás componentes de la matriz en la medición de la liberación de niclosamida por espectrofotometría UV-vis, se realizó una medición simple de los espectros de absorción de cada componente como se puede apreciar en la Figura 21.

En estos espectros se puede identificar que el fotoiniciador TPO posee un amplio rango de absorción desde los 300 nm hasta los 400 nm aproximadamente. Además, la niclosamida posee un pico de absorción a 333 nm. Esto podría estar generando una interferencia en la medición por espectrofotometría UV- Vis, de tal manera que podrían estar liberándose moléculas de TPO desde el impreso y sobreestimando la concentración de niclosamida. Para solucionar esta interferencia, las mediciones de los futuros ensayos de liberación se harán mediante HPLC, con el fin de poder separar los compuestos y poder obtener datos cuantitativos de concentración de niclosamida liberada.

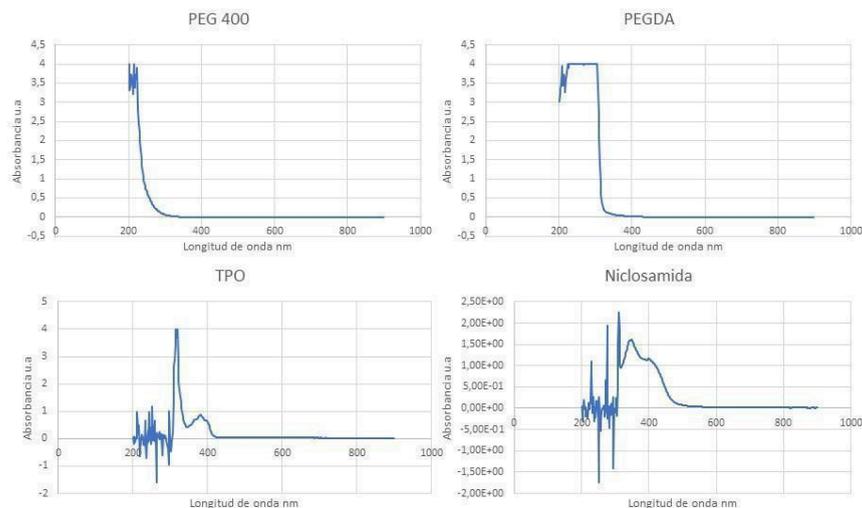


Figura 21 Espectros de absorción PEG, PEGDA, TPO y niclosamida por UV-Vis.

Conclusiones del subcapítulo 1 (PEGDA 250)

1. De las matrices diseñadas se puede concluir que se encontró una región de trabajo en donde se solubiliza correctamente el activo. Los materiales fueron imprimibles mediante la técnica de SLA y se logró un control de la liberación del activo desde los dispositivos. Sin embargo, las dimensiones del sólido obtenidas tras la impresión no fueron las deseadas, esto se puede deber a que no se encontraron los límites exactos de los parámetros que afectan a la calidad de la impresión, como concentración de fotoiniciador, tiempos de exposición o el diseño digitalizado. Es por lo que en un futuro se pueden variar estos parámetros para lograr la morfología final deseada.

2. Los estudios de liberación arrojaron que, si existe una liberación de la niclosamida desde el dispositivo impreso, sin embargo, aún se desconoce cuál es el mecanismo de liberación. El PEGDA 250 tiene más acrilatos disponibles en su estructura, por lo que el grado de entrecruzamiento será mayor que en un PEGDA 575. Es por esto por lo que se escogerá este polímero de peso molecular más alto para los siguientes estudios, con el fin evaluar el efecto que tiene el grado de entrecruzamiento en la liberación de niclosamida.

3. Adicionalmente, para los ensayos de liberación de niclosamida se realizarán las mediciones mediante HPLC y no mediante espectrofotometría UV-Vis. Esto con el fin de poder estudiar la liberación del fármaco cuantitativamente y además discernir si los valores de concentración

de niclosamida se están viendo afectados por la liberación de otros componentes de la matriz, como el fotoiniciador TPO.

Subcapítulo 2: PEGDA 575

Estabilidad de las matrices

Previo a la incorporación de los nanosistemas AuNRs 2 y AuNRs 1 a las matrices poliméricas, las AuNPs fueron funcionalizadas con PEG-Ome y PEG-COOH respectivamente con el fin de mantener la estabilidad coloidal a lo largo de los procesos de impresión y caracterización. Al momento de agregar los nanosistemas pegilados a las matrices, estos dieron origen a líquidos límpidos y homogéneos en donde no se apreciaron agregados ni separación de fases como se puede observar en la Figura 22 a). Además, se mantuvo la estabilidad de los nanosistemas por un periodo de al menos 30 días en donde se realizó una medición por espectrofotometría UV-Vis con el fin de observar el plasmón característico de las AuNRs 2 y AuNRs 1, como se puede observar en la figura 22 b) y c).

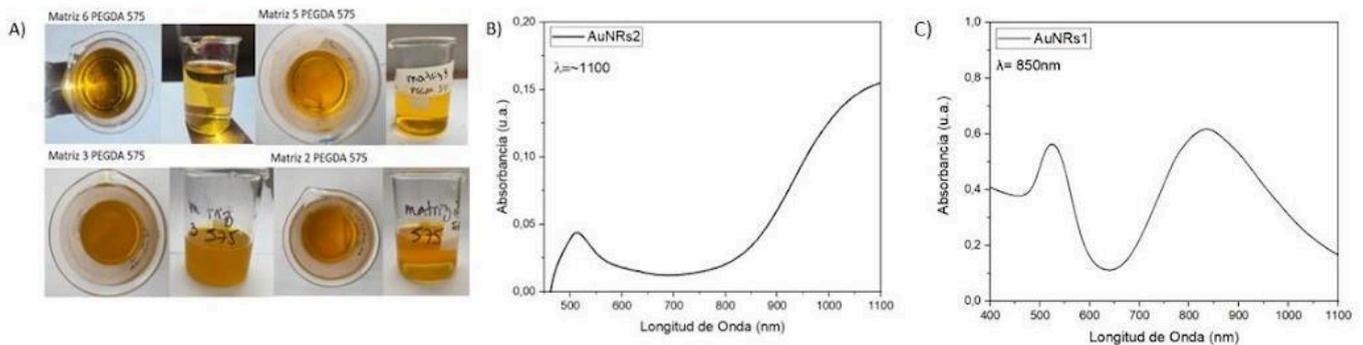


Figura 22. a) Imágenes de las matrices 2, 3, 5 y 6 tras la incorporación de todos los componentes de la matriz. b) y c) Caracterización AuNRs2 y AuNRs1 respectivamente en matriz polimérica por espectrofotometría UV-Vis.

Reologías matrices PEGDA 575

Al igual que para las matrices con PEGDA 250. El comportamiento de las matrices formuladas por PEGDA 575 poseen un comportamiento de flujo newtoniano indicando que la viscosidad del fluido no varía con la velocidad de corte.

Los gráficos de viscosidad aparente y la curva de flujo se pueden observar en la Figura 23.

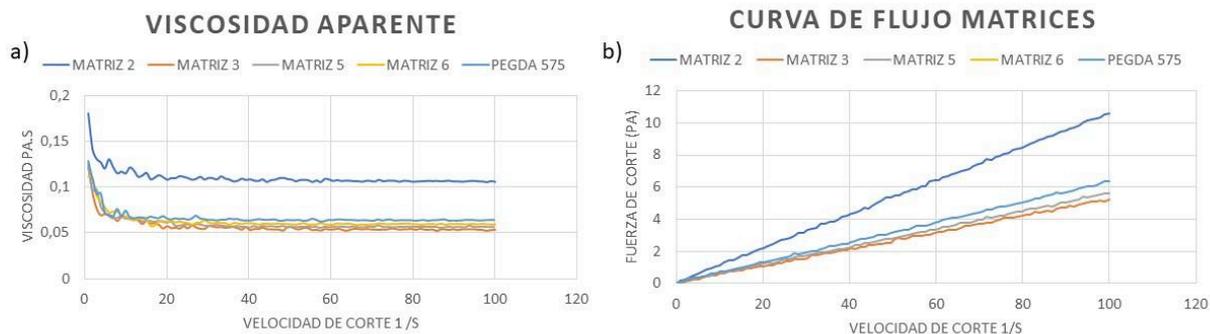


Figura 23 a) Viscosidad aparente Matrices PEGDA 575 b) Curva de flujo Matrices PEGDA 575

Impresión en 3D

El proceso de impresión fue el mismo que se utilizó para el PEGDA 250. Sin embargo, al diseño digital de los cilindros, se le agregó un soporte con el fin de poder mejorar la adhesión del impreso a la cama de impresión y así obtener sólidos de las dimensiones deseadas.

Posteriormente se envió el archivo digital a la impresora Anycubic Photon S y se empezó el proceso de impresión, el cual duró aproximadamente 1 hora y 30 min.

La matriz 2 se sometió al proceso de impresión y el resultado obtenido fueron semisólidos que quedaron retenidos en el fondo de la batea y no sobre la cama de impresión como se esperó. Estos dispositivos no pudieron someterse a las pruebas de caracterización ya que al momento de retirarlos desde la batea se desintegraron y no pudieron aislarse como los otros impresos. Las características inestables de estos dispositivos se podrían atribuir a la composición de la matriz y al peso molecular del polímero PEGDA 575 y a la cantidad de este mismo presente en la matriz. Al existir menos grupos acrilatos disponibles para la reacción de fotopolimerización por la cual se obtiene la solidificación de la resina, se podría esperar que la obtención de dispositivos sólidos con este polímero requiera un mayor tiempo de irradiación o mayor concentración de fotoiniciador.

Las matrices 3 y 5 dieron origen a impresos incompletos como se puede observar en la Figura 24, estos también quedaron retenidos en la batea y no se obtuvieron las dimensiones esperadas, sin embargo, estas matrices al poseer una mayor concentración de PEGDA dieron origen a impresos con mejor características sólidas que la matriz 2.

Finalmente, la matriz 6, con mayor concentración de PEGDA, se sometió al proceso de impresión y dio como resultado un dispositivo totalmente sólido y con dimensiones esperadas como se puede apreciar en la Figura 25.a. Adicionalmente este dispositivo cuando se somete al proceso de curado sufre un cambio en la coloración, desde un color amarillo pálido, casi incoloro a un rojo intenso (Figura 25.b). En el proceso de curado se somete al dispositivo a una irradiación con el fin de solidificar restos de resina líquida que podrían haber quedado tras el lavado y el proceso de impresión. Esto dio indicios de una correcta incorporación de los niclosamida a la matriz. Adicionalmente se concluye que la impresión de esta matriz fue exitosa y reproducible, por lo que estos sólidos son los mejores candidatos para cumplir los objetivos de esta tesis.

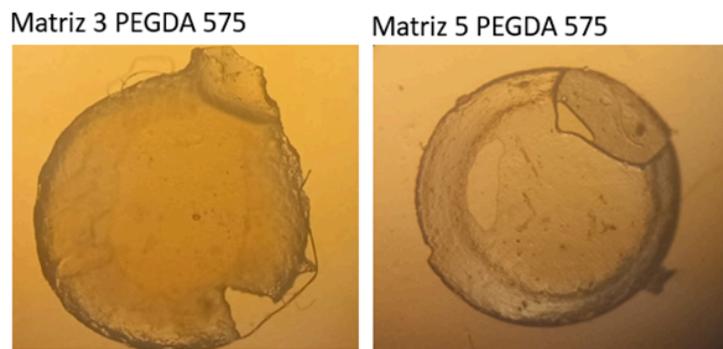


Figura 24 Imágenes obtenidas por microscopía óptica de los impresos resultantes de las matrices 3 y 5 con PEGDA 575

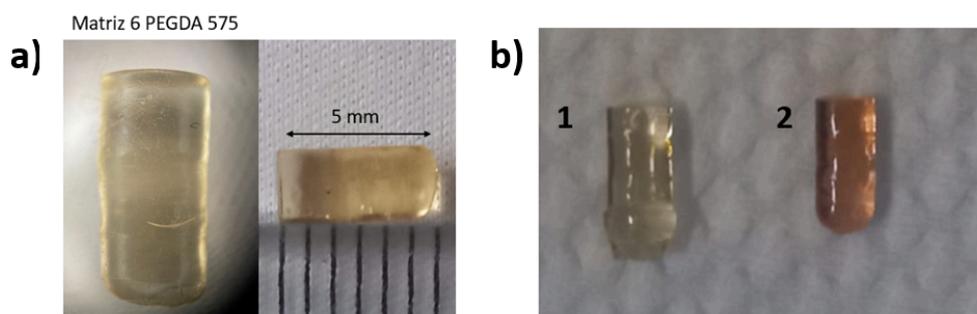


Figura 25. a) Imágenes del dispositivo impreso resultante de la matriz 6 con PEGDA 575 b) 1. Dispositivo previo al proceso de curado b) 2. Dispositivo posterior al proceso de curado

Estudios de Uniformidad de Peso:

La metodología para hacer el estudio de uniformidad de peso fue la misma que la utilizada para las matrices con PEGDA 250. Adicionalmente los impresos de la matriz 2 no se pudieron someter a esta caracterización por las razones comentadas en el ítem anterior.

El peso promedio para la matriz 3 y 5 fue de 1,1 y 1.0 mg respectivamente como se puede apreciar en la Tabla 8, esto se debe a las irregularidades en la impresión, no alcanzaron un tamaño ni consistencias deseadas, por lo que es concordante con el peso de cada dispositivo.

Para la matriz 6 el peso promedio fue de 36 mg y se estimó que la cantidad de niclosamida por dispositivo es de 0.12 mg.

***Tabla 8** Peso promedio y desviación estándar de 10 dispositivos sólidos impresos por cada matriz. Estimación de cantidad de niclosamida por dispositivo*

Matriz	Peso promedio mg	Desviación estándar	Cantidad de niclosamida por dispositivo mg.
3	1,06	0,17	0,0046
5	1,6	0,19	0,0068
6	36	1,34	0,12

Microscopía electrónica de barrido SEM.

Con el objetivo de poder visualizar que es lo que les ocurre a los dispositivos sólidos a nivel estructural cuando son expuestos a diferentes estímulos se propuso un ensayo realizado a través de microscopía electrónica.

En la Figura 26 se puede observar a modo de control la niclosamida en estado cristalino y sólido.

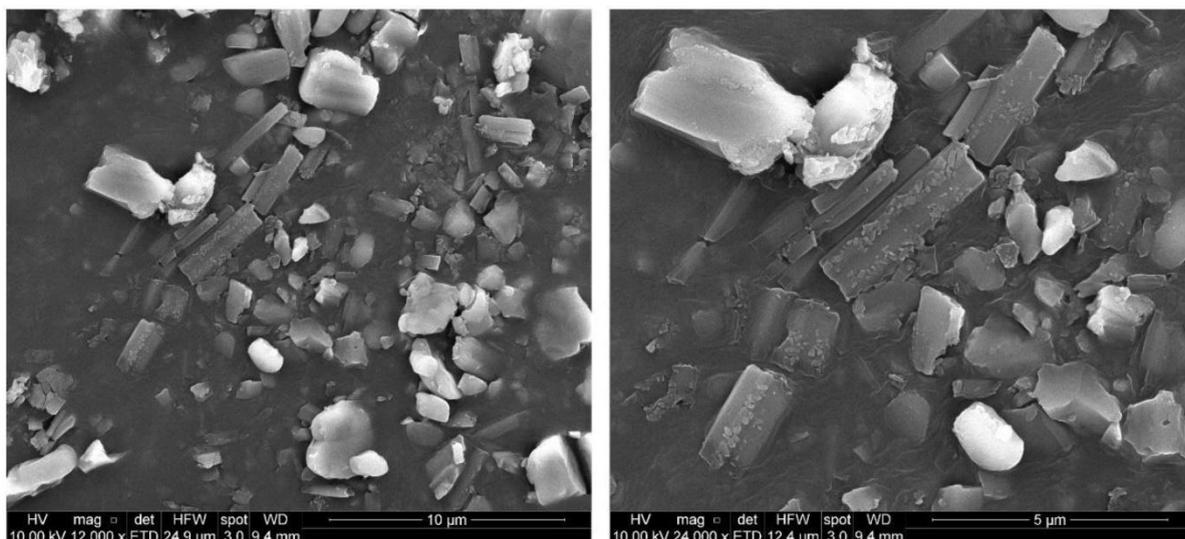


Figura 26. *niclosamida en cristales mediante microscopia electrónica de barrido SEM*

En primer lugar, se realizaron las caracterizaciones de los dispositivos sólidos obtenidos a partir de la matriz 6, debido a que esta fue la única matriz que dio origen a sólidos con dimensiones físicas esperadas según el diseño digital. Adicionalmente todos los dispositivos en este experimento fueron sumergidos en una solución de PBS con Tween 80 al 1% a excepción de la Figura 27 c. que se sometió a una caracterización inmediatamente después de la impresión.

Para todos los dispositivos sumergidos en PBS se generó un aumento de peso en aproximadamente 2 mg indicando un posible “*swelling*” o hinchamiento del sólido al absorber agua, esto es concordante con las características hidrofílicas de los polímeros utilizados.

A modo de control se sumergieron los dispositivos sin AuNRs 2 en el medio por 5 minutos con la diferencia de la exposición o no a la irradiación. En el caso de los dispositivos sin irradiar como se puede apreciar en la Figura 27 a). Se observó inicialmente una ruptura mecánica del dispositivo tras exponerse al medio, esto puede producirse por la diferencia de presiones generadas por la hidratación o *swelling* del dispositivo. El ingreso del agua hacia el dispositivo produce un reordenamiento de las cadenas poliméricas permitiendo la hidratación, para que esto ocurra y el dispositivo conserve las propiedades mecánicas macroscópicas, el polímero debe sufrir una transición vítrea que le permita cambiar su estado vítreo a un estado más elástico. En esta situación, la temperatura de transición vítrea podría no disminuir lo

suficiente como para alcanzar el estado elástico y es por esto por lo que, el sólido se fractura al hidratarse

En el caso de los dispositivos sin AuNRs 2 que fueron sometidos a irradiación como se puede apreciar en la Figura 27 b) no se observó un quiebre del material, esto podría significar que el aumento de temperatura inducido sólo por la acción del láser permite alcanzar estados más elásticos del material, lo que permite conservar las propiedades mecánicas del dispositivo al sumergirse en un medio acuoso

En ambos casos en donde no se incorporaron nanopartículas se pudo observar la cristalización de niclosamida en la superficie de los dispositivos. Esto podría estar afectando a la liberación de niclosamida, al encontrarse en estados cristalinos se presentará una menor solubilidad que en estados amorfos o solubilizados, afectando la cuantificación de niclosamida en los ensayos de liberación, sin embargo, esto se podría investigar con más profundidad a futuro mediante difracción de rayos X.

En la Figura 27 c) se puede observar a los dispositivos con AuNRs 2 posterior al proceso de impresión y sin ser expuestos a ningún estímulo, se puede apreciar que la superficie es lisa y se logran distinguir las capas de impresión, adicionalmente no se ven nanopartículas en la superficie ni cristales de niclosamida.

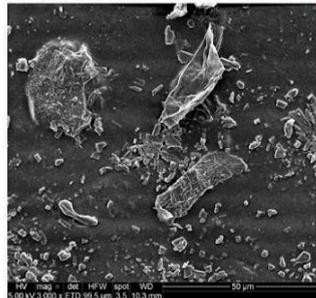
En la Figura 27 d) se observan las imágenes SEM de los dispositivos con AuNRs 2 sumergidos sin irradiación, en este caso se observó una fractura del sólido, al igual que en los dispositivos sin AuNRs y sin irradiación, el dispositivo se fractura cuando se hidrata, es decir, en ausencia de calor, no se alcanzan las características elásticas del material que permiten mantener las propiedades mecánicas al exponerse a medios acuosos.

En la Figura 27 e) se observan los dispositivos con AuNRs 2 sumergidos y expuestos a la irradiación. En esta ocasión no se observaron rupturas mecánicas del impreso, esto atribuido a la generación de calor producido por el láser y también podría contribuir el calor generado por la excitación de los AuNRs 2 cuando son expuestos a láser de 1064 nm. Con más aumento, se puede observar el aumento de la rugosidad en la superficie. Este fenómeno podría ser explicado por el efecto fototérmico las AuNRs 2 excitadas que producen una erosión de la matriz.

En todos los casos en donde se incorporaron AuNRs 2 a los dispositivos, no se observó recristalización de la niclosamida en la superficie. Esto indica una posible interacción entre las AuNRs 2 y la niclosamida. En literatura se ha descrito que la molécula de niclosamida puede generar interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrogeno y tipo van der Waals con algunas moléculas biológicas como pepsina, globulina y hemoglobina.^{69,84} A partir de esto, se podría proponer la generación de un ambiente hidrofóbico por las moléculas de PEG-Ome ancladas a la superficie de los AuNRs 2, de esta manera, se podría generar una especie de protección a la molécula de niclosamida impidiendo su cristalización en la superficie y modificando la liberación desde el dispositivo.

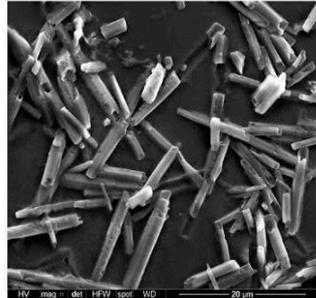
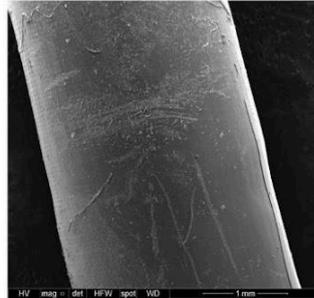
Adicionalmente se observó bajo el microscopio el dispositivo semisólido obtenido tras la impresión de la matriz 5 con AuNRs 2 como se muestra en la Figura 28. Esta matriz posee una proporción de PEG 400 y esta podría estar incluida entre las redes entrecruzadas del polímero fotosensible PEGDA. De esta manera se puede observar a 200 μm como la superficie del sólido demuestra un menor grado de reticulación.

a) Irradiación -

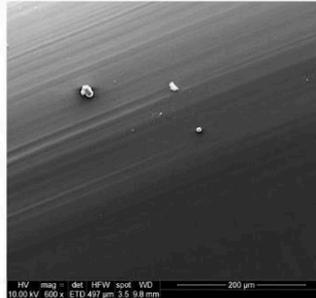
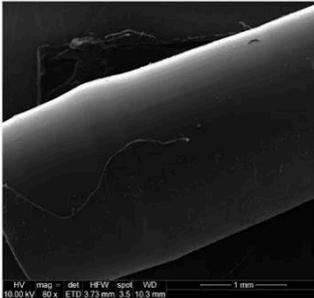


Sin AuNRs 2

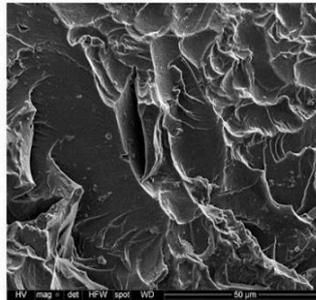
b) Irradiación +



c) Irradiación -
Post-Impresión



d) Irradiación -



Con AuNRs 2

e) Irradiación +

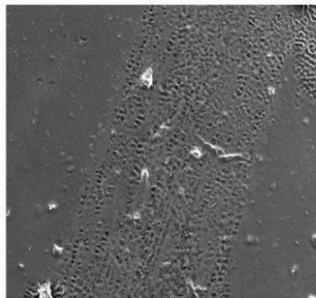
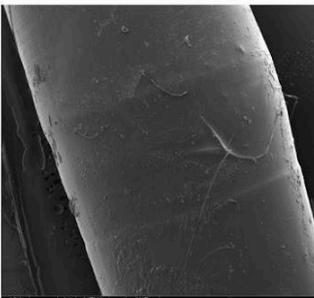


Figura 27. Microscopía electrónica de dispositivos impresos de la Matriz 6 con AuNRs 2 de PEGDA 575 sometidos a distintas condiciones.

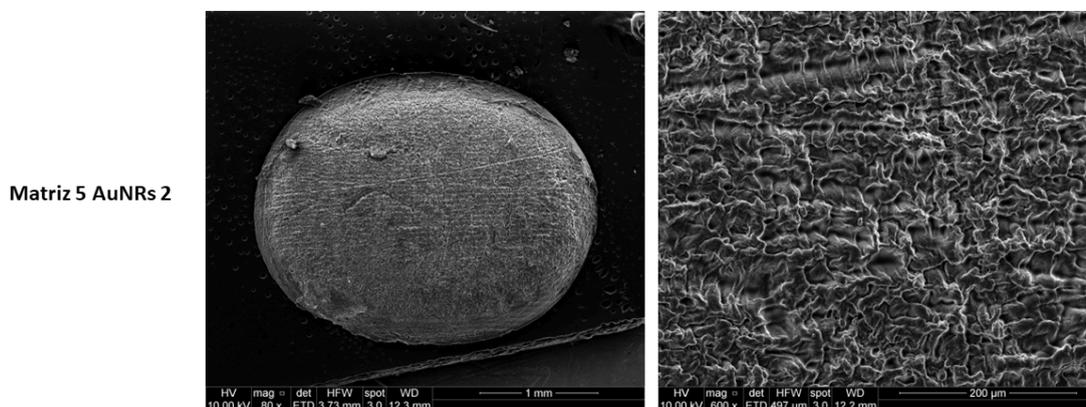


Figura 28 Matriz 5 AuNRs 2 PEGDA 575 por microscopía electrónica de barrido.

Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDX)

Se realizó un análisis elemental del dispositivo impreso de la matriz 6 con PEGDA 575 con AuNRs de 1064 nm como se muestra en la Figura 29. Los datos del porcentaje de composición de cada elemento se pueden observar en la Tabla 9. El carbono y oxígeno son los elementos más abundantes en el sólido, esto se debe a las moléculas orgánicas que forman parte de su estructura como el PEGDA 575 y el PEG 400. El cloro presente se puede atribuir a la molécula de niclosamida, esto puede confirmar la correcta carga del fármaco en el dispositivo. El fósforo presente se puede deber a la molécula de TPO que posee en su estructura este elemento.

Según la reacción de fotopolimerización la molécula de TPO se degrada en dos radicales libres, benzoilo y ácido de fósforo, estos son los responsables de comenzar la reacción de polimerización del PEGDA, entregándoles esos radicales libres a los extremos acrilatos disponibles. Es por esto que, a futuro, sería necesario poder caracterizar en qué forma se encuentra este fósforo, si en forma de radical o en moléculas sin reaccionar de TPO.

Es importante mencionar, que en el análisis elemental no aparece el oro, esto podría dar señales de que las concentraciones utilizadas de nanopartículas son lo suficientemente pequeñas para no ser detectadas por el equipo.

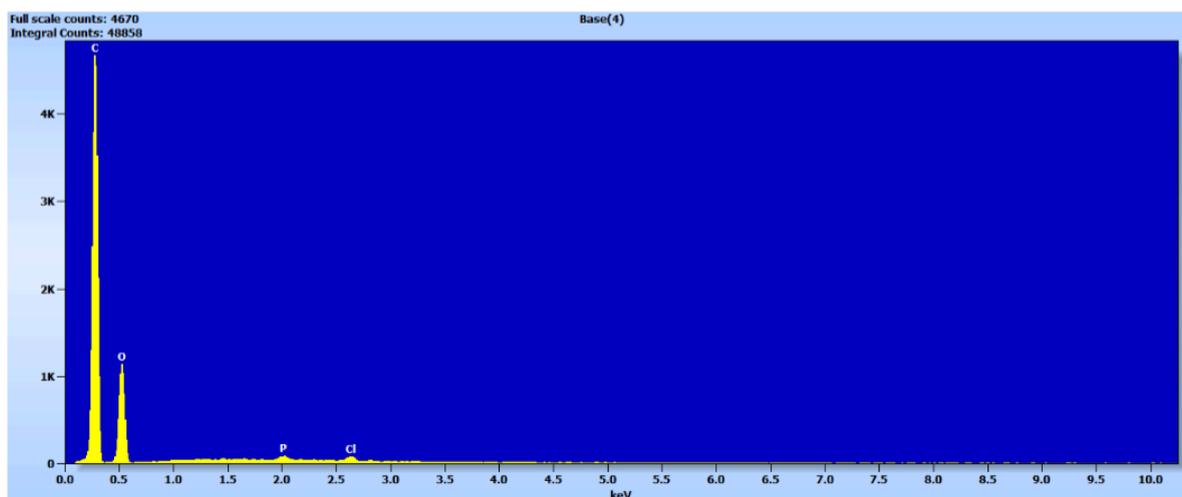


Figura 29. Análisis elemental de dispositivo sólido de matriz 6 AuNRs 2 PEGDA 575.

Tabla 9 Caracterización de composición porcentual elemental del dispositivo impreso de la matriz 6 con PEGDA 575

Elemento	Composición %
Carbono	50,7
Oxígeno	48,2
Fósforo	0,48
Cloro	0,44
Total	100

Efecto fototérmico.

Con el fin de evaluar la inclusión de las nanopartículas en los impresos se evaluó el efecto fototérmico mediante la irradiación con láser de 1064 nm para los impresos con AuNRs 2 y 808 nm para los que contenían AuNRs 1. En la Figura 30 se observa un aumento de la temperatura desde 21,8°C hasta 45,5°C tras 5 minutos de irradiación con el láser de 1064 nm para los dispositivos con AuNRs 2. Que el dispositivo haya aumentado la temperatura en 23,7 °C tras la irradiación indica que la concentración utilizada de éstas fue la suficiente para producir un efecto fototérmico y que se incorporaron al dispositivo impreso.

Para las AuNRs 1 se observa un aumento de temperatura de 4,3 °C tras la irradiación por 5 min a 808 nm. El dispositivo control que fue sometido a las mismas condiciones, solo aumentó en 0,3°C tras la irradiación. Esto podría indicar que las AuNRs1 se incorporaron correctamente a la matriz y en la concentración suficiente para generar un efecto fototérmico.

En comparación, las AuNRs 2 poseen una mayor eficacia fototérmica que las AuNRs 1, esto se puede deber a las diferencias en el tamaño ya que, al limitar la movilidad de los electrones en la superficie, se dará origen a distintas intensidades de fototerapia cuando estos sean excitados.

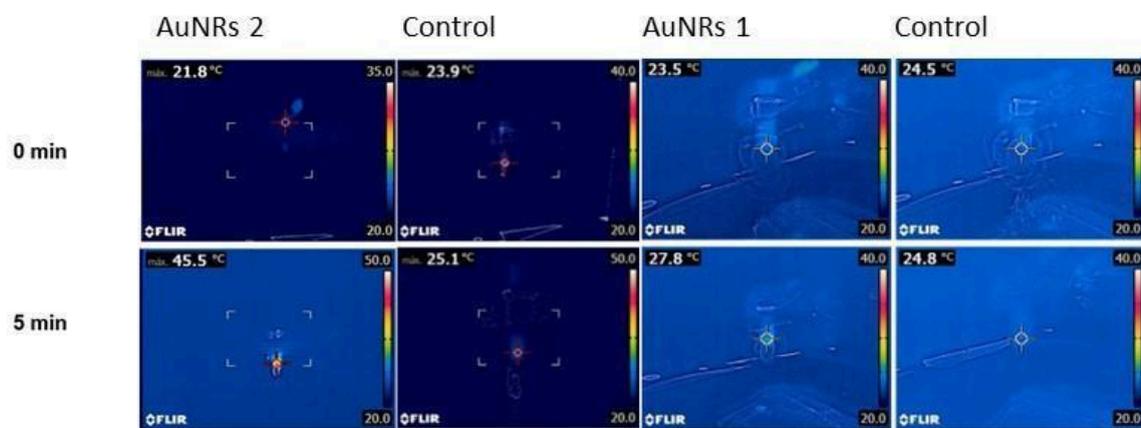


Figura 30. Efecto fototérmico de dispositivos impresos de la matriz 6 PEGDA 575 tras la irradiación a 1064 nm por 5 min

Resonancia magnética nuclear de fósforo PNMR

La utilización de fotoiniciadores en resinas para impresión en 3D es un gran desafío debido a que la mayoría producen toxicidad en sistemas biológicos⁵⁹. Es por esto que se realizó un seguimiento al núcleo de fósforo de la molécula de TPO durante el proceso de impresión. Se tomaron alícuotas de las matrices 5 y 6 con AuNRs 2 antes y después de la impresión. También se pulverizaron los dispositivos sólidos mediante congelación con nitrógeno líquido y se disolvieron en el solvente DMSO d-6. En la Figura 31 se observan los espectros PNMR de las matrices y el sólido. En todas las mediciones aparece el núcleo de fósforo. Esto confirma la presencia de TPO en las muestras sólidas pulverizadas, en las matrices líquidas antes y posterior a la impresión. Si bien, se confirma la presencia de fósforo en los sólidos obtenidos, no se confirma la liberación de estas moléculas al medio, es por esto que el estudio

de liberación de esta TPO y la medición de la concentración de la misma en un medio adecuado sería determinante para la toxicidad que podría llegar a tener el dispositivo final.

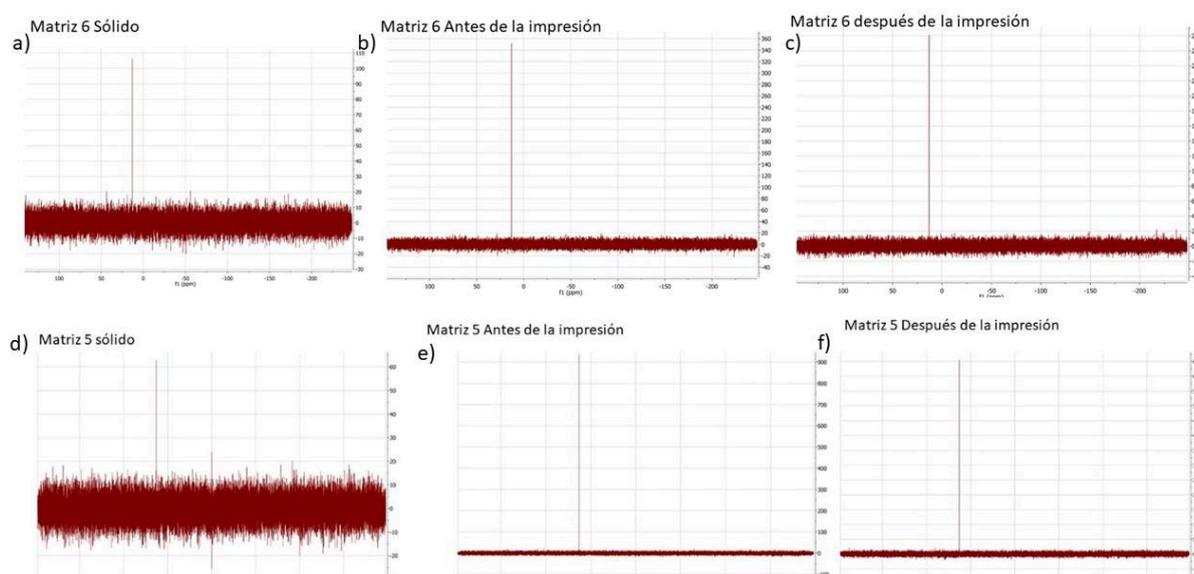


Figura 31. Resonancia magnética nuclear de fósforo. En a) Matriz 6 sólido pulverizado y disuelto en DMSO-d6. En b) Matriz 6 líquida antes de la impresión. En c) Matriz 6 líquida posterior al proceso de impresión. En d) Matriz 5 sólido pulverizado y disuelto en DMSO d-6, en e) Matriz 5 líquida previo a la impresión, en f) Matriz 5 líquida posterior a impresión. Matrices con AuNRs2 y PEGDA 575.

Espectroscopía infrarroja IR/FITR

Se realizaron medición de IR y FITR con el fin de poder estudiar la aparición o desaparición de enlaces mediante el proceso de polimerización cuando se solidifica la resina.

En la Figura 32 se puede observar la matriz 5 y 6 con AuNRs 2, en rojo la matriz antes de la impresión, sin exposición a la luz, en negro la matriz líquida después del proceso de impresión y en azul el sólido pulverizado. En las matrices líquidas se pueden observar bandas características de la amida presente en la niclosamida cercano a $3600 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ ⁸⁴. La señal C-H cercano a $3000 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ corresponde a los metilenos del PEGDA y de la niclosamida. La señal de C=O aparece cercano a $1700 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ corresponde al grupo cetónico presente en la molécula de PEGDA. La señal que aparece en $1600 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ C=C corresponde al grupo acrilato del PEGDA 575, esta señal desaparece en la medición del sólido dando un indicio de que la

reacción de polimerización ocurrió y estos grupos reaccionaron. La señal P=O presente en 1400 cm^{-1} corresponde a la señal del grupo cetónico del TPO y sólo se encuentra presente en las matrices líquidas, esto podría significar que en el sólido no quedan moléculas de TPO o que su concentración relativa es baja, como se verifica en el RMN de fósforo. Finalmente, la señal C-O presente cercano a $1100\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ corresponde al grupo éster del PEGDA y se encuentra presente en todas las mediciones.

De estos resultados se puede concluir que la reacción de fotopolimerización se llevó a finalidad de manera exitosa.

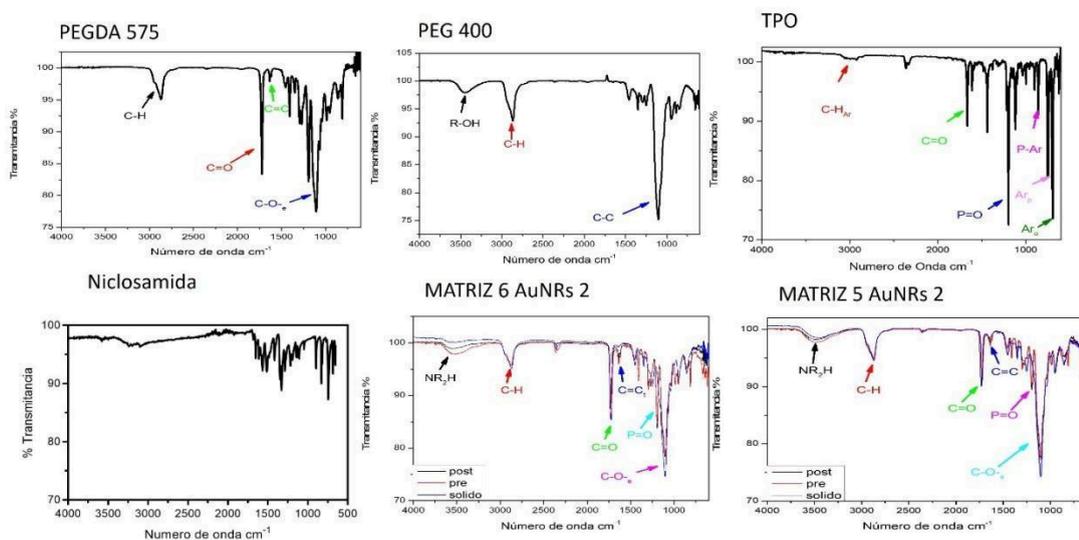


Figura 32. Espectros IR de PEGDA 575, PEG 400, TPO, niclosamida y muestras sólidas y líquidas de las matrices 5 y 6 con AuNRs2 y PEGDA 575.

Estudios de Liberación

Con el fin de evaluar si la incorporación de nanopartículas de oro en resinas poliméricas para impresión en 3D confiere la capacidad de controlar la liberación de un fármaco modelo desde el dispositivo sólido terminado, se realizaron estudios de liberación ocupando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución HPLC.

Inicialmente se realizó una curva de calibración de niclosamida con el fin de poder interpolar en la recta las concentraciones de los estudios de liberación posteriores como se observa en la figura 33.

Curva de calibración niclosamida

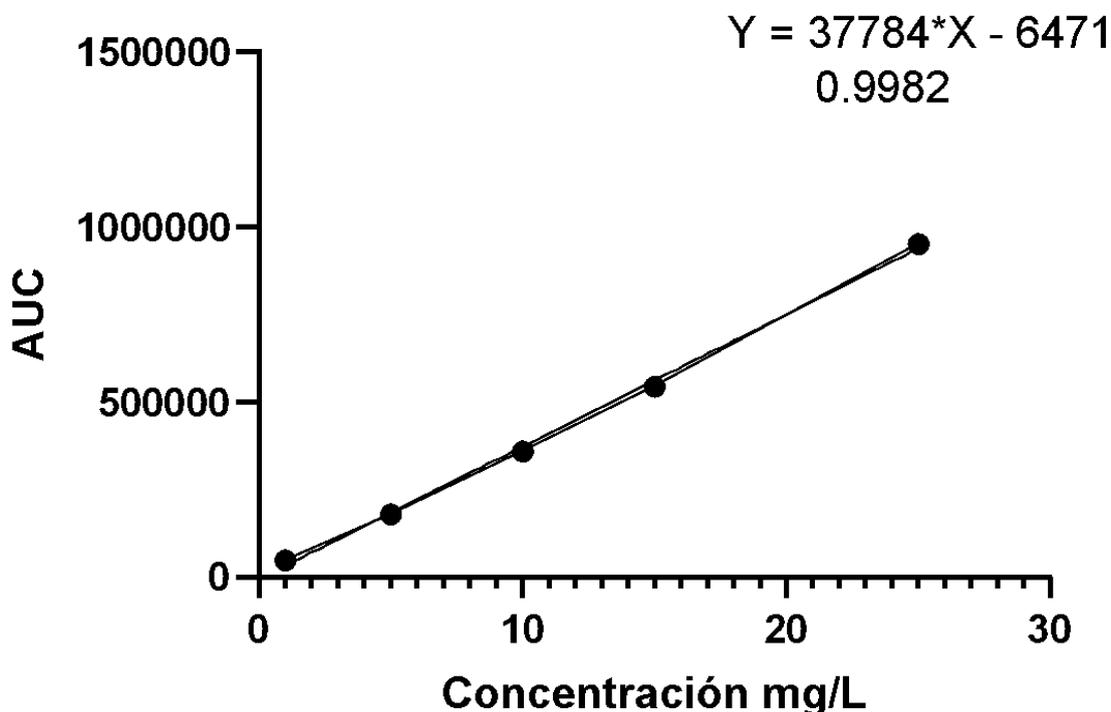


Figura 33 Curva de calibración de niclosamida en PBS Tween 80 1% por HPLC. Rango de concentraciones desde 1 mg/L hasta 25 mg/L.

Estudios de liberación con irradiación:

En primer lugar, se realizaron estudios de liberación con irradiación, en donde se compararon 3 perfiles de liberación distintos a partir de dispositivos que contenían AuNRs 2, AuNRs1 y control sin Au. En la Figura 34 se puede observar que para las AuNRs 2 se generó una liberación creciente desde el minuto 1 al 5 en donde se mantuvo constante hasta el minuto 15, alcanzando el pico más alto de liberación con un porcentaje de liberación del 4 %. Para el caso de las AuNRs 1 se observó una liberación creciente hasta el minuto 8 alcanzando un porcentaje de liberación cercano al 5%, posteriormente decayó hasta el minuto 15.

En el caso de los dispositivos sin AuNRs sometidos a irradiación se observó una liberación constante y menor que cualquiera de los puntos de los dispositivos irradiados.

Esto podría significar, que la incorporación de AuNRs a los dispositivos impresos en 3D permitió gatillar un mecanismo de liberación de niclosamida cuando estas fueron excitadas mediante un láser de 1064 o 808 nm. En los dispositivos sin AuNRs se observó una

liberación inicial que se mantuvo constante y es atribuible al *swelling* o hinchamiento del dispositivo cuando este es sumergido en un medio acuoso.

Para poder estudiar el mecanismo de liberación del fármaco desde el dispositivo propuesto se utilizó un programa que permitió ajustar los datos obtenidos a distintos modelos matemáticos como se puede observar en la Tabla 10.

En este caso, el modelo cinético al que más se ajustaron los datos obtenidos fue el modelo de Peppas-Sahlin. Esta es una modificación de la ecuación de Korsmeyer-Peppas que además de describir los mecanismos de liberación en sistemas poliméricos, permite obtener valores de constantes de difusión asociadas a mecanismos por difusión Fickiana y mecanismos de difusión no Fickiana ^{85,86}, como se puede observar en la Ecuación 1:

Ecuación 1. Ecuación de Peppas- Sahlin:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m}$$

En donde:

M_t/M_∞ = % Liberación

K_1 = Constante de velocidad asociada a difusión de Fick

K_2 = Constante de velocidad asociada a mecanismos no Fickiana

m = Mecanismo de liberación Fickiana asociada a cualquier geometría (cilindros, películas, tabletas)

En este se evidenció que para las AuNRs 2 el modelo de cinética de liberación que más se ajustó fue el modelo de Peppas -Sahlin con un R^2 de 0,98. El valor de m es igual a 0,33 lo que da indicios de un mecanismo de liberación por difusión Fickiana, esto cobra sentido ya que las formulaciones farmacéuticas son de naturaleza polimérica y los modelos matemáticos de Korsmeyer explican la liberación desde formulaciones de la misma naturaleza.

Para las AuNRs 1 el modelo que más ajustó fue el de Peppas-Sahlin con un R^2 de 0,9442 con un $m < 0,5$ describiendo un mecanismo de difusión Fickiana.

Para los dispositivos sin AuNRs también ajustaron a Peppas- Sahlin con un R^2 de 0,9451 y un valor de $m = 0,25$. Esto indica un mecanismo de liberación por difusión Fickiana al igual que para los otros dos sistemas.

Comparación de perfiles de liberación

Para comparar perfiles de liberación de fármacos se obtuvo el valor de $F2^{76,87}$ comparando todos los pares posibles a partir de los perfiles de AuNRs 2, AuNRs 1 y sin Au. Este valor cuantifica la similitud entre perfiles de liberación y puede adoptar valores de 0 a 100 donde:

- $F2 > 50$: Se consideran perfiles similares
- $50 > F2 > 10$: Se consideran moderadamente similares
- $F2 < 10$: Se consideran perfiles diferentes

Los valores de $F2$ obtenidos a partir de los datos obtenidos experimentalmente fueron:

$F2$ entre AuNRs 1 y AuNRs2: 93,09

$F2$ entre AuNRs 1 y sin Au: 86,57

$F2$ entre AuNRs 2 y sin Au: 93,10

De esto se puede concluir que los perfiles de liberación de los dispositivos son similares entre sí, sin embargo, poseen distintos porcentajes de liberación y esto podría atribuirse a la presencia de AuNRs, de tal manera que permiten una mayor liberación en función del tiempo.

Liberación con Irradiación PEGDA 575

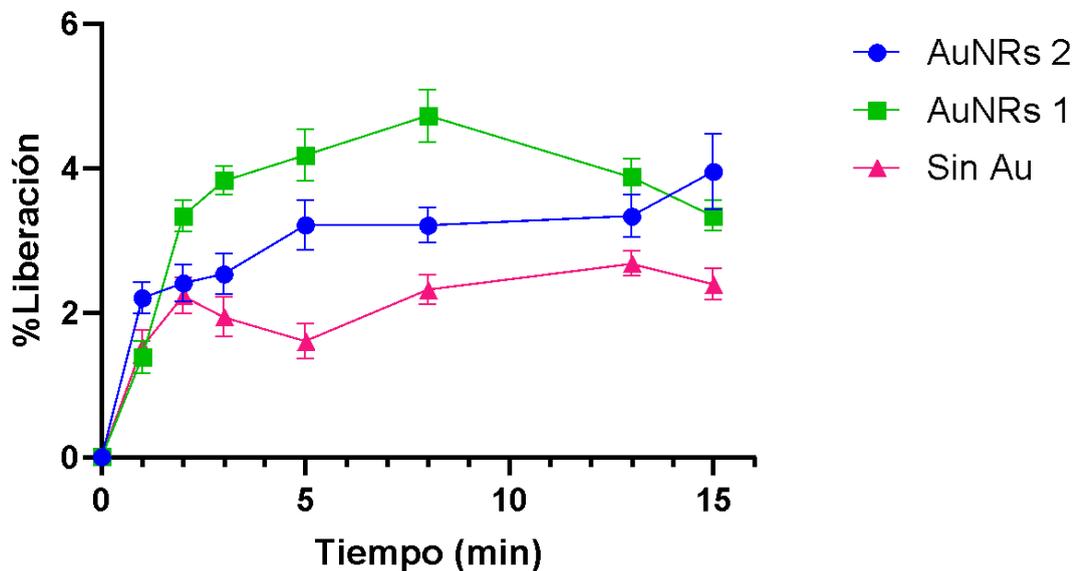


Figura 34. Perfiles de liberación de niclosamida desde dispositivos impresos sólidos de la matriz 6 PEGDA 575 con AuNRs 2, AuNRs 1 y Sin Au.

Adicionalmente al realizar las mediciones en HPLC solo se observó un pico característico de la niclosamida en 4 min del tiempo de retención. Esto quiere decir que no hay liberación de otros componentes que absorban en las longitudes de ondas estudiadas. (290-350 nm.).

Tabla 10. Ajustes cinéticos para la liberación de niclosamida desde dispositivos de la matriz 6 PEGDA 575 con AuNRs2, AuNRs 1 y sin Au.

MODELO	AuNRs2	AuNRs1	SIN AU
ORDEN CERO	$R^2= 0,3460$	$R^2= 0,6699$	$R^2= 0,6090$
ORDEN UNO	$R^2= 0,3231$	$R^2= 0,6414$	$R^2= 0,5930$
HIGUCHI	$R^2= 0,6694$	$R^2= 0,7882$	$R^2= 0,4722$
KORSMEYER-PEPPAS	$R^2= 0,9778$ $n = 0,2014$ $k = 2,1454$	$R^2= 0,7090$ $n = 0,2759$ $k = 2,1773$	$R^2= 0,8980$ $n = 0,1525$ $k= 1,6283$
PEPPAS- SAHLIN	$R^2= 0,9873$ $m = 0,3313$ $k = 2,458$ $k2=0,3775$	$R^2= 0,9442$ $n =0,4500$ $k= 3,209$ $k2=0,6243$	$R^2= 0,9451$ $n = 0,2500$ $k = 1,914$ $k2= 0,3611$

Estudios de liberación sin irradiación

Para los estudios de liberación sin irradiación se dispusieron de dispositivos con AuNRs 2 sumergidos en PBS/Tween 80 1% y se dejaron en agitación sin exponerse al estímulo de la irradiación. Los resultados arrojaron una liberación creciente y sostenida en el tiempo hasta alcanzar el 3 % de liberación en su punto máximo a los 120 minutos como se puede apreciar en la Figura 33.

El perfil de liberación sin irradiación se ajustó al modelo matemático de Peppas-Sahlin sugiriendo una difusión Fickiana al igual que para los dispositivos irradiados como se puede observar en la Tabla 11.

Liberación PEGDA 575 sin irr

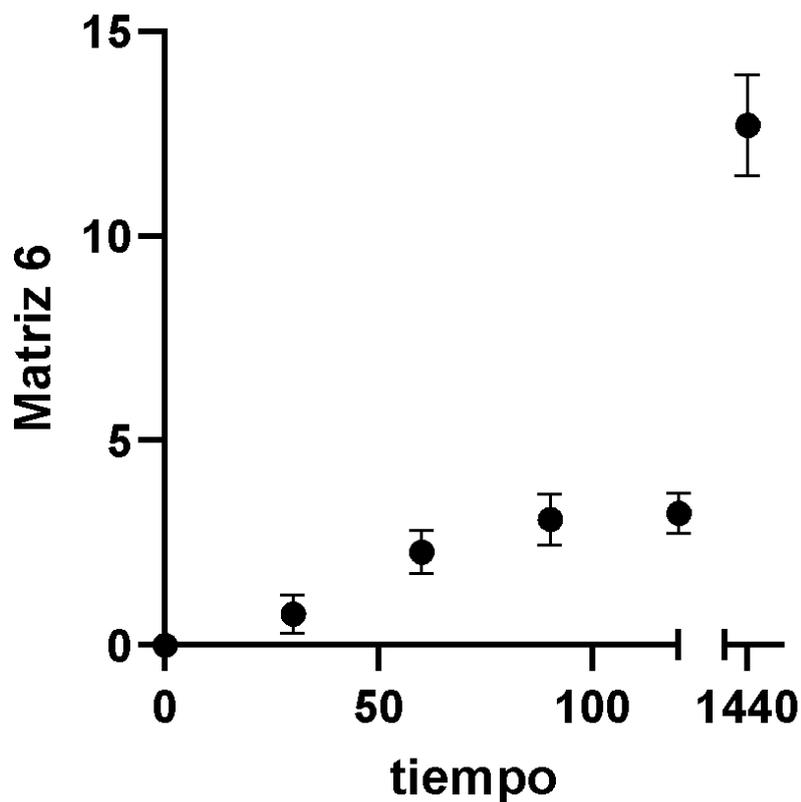


Figura 35. Liberación de niclosamida sin irradiación desde dispositivos de la matriz 6 con PEGDA 575

Tabla 11. Ajustes matemáticos a cinéticas de liberación dispositivos sin irradiación.

MODELO	R ²
ORDEN CERO	0,8677
ORDEN UNO	0,8752
HIGUCHI	0,9835

KORSMEYER-PEPPAS	0,9785 n = 0,6047 k = 0,1504
PEPPAS-SAHLIN	0,9967 n = 0,45 k 1= 0,3 k2= 0,0075

Comparado con los dispositivos irradiados, aquellos que no fueron irradiados mostraron una disminución en el porcentaje de liberación de niclosamida en casi todos los puntos. Sin embargo, con el transcurso del tiempo, se logró alcanzar un 3% de liberación. Para alcanzar las concentraciones de fármaco obtenidas con la irradiación, se necesita exponer a los dispositivos no irradiados durante un periodo más prolongado de tiempo en el medio, permitiendo que el fármaco difunda desde la matriz. La incorporación de nanosistemas en los dispositivos podría estar acelerando este proceso de difusión gracias al efecto fototérmico producido por las AuNRs cuando se exponen a irradiación.

Conclusiones subcapítulo 2: PEGDA 575

- Se encontró una región de trabajo en donde la matriz propuesta (matriz 6) logró desarrollar un dispositivo sólido de las dimensiones esperadas según el diseño digital.
- La incorporación de AuNRs a las matrices poliméricas no provocó separación de fases ni desestabilizaciones observables a simple vista, además las mediciones de espectrofotometría UV-Vis arrojaron que las AuNRs se mantuvieron durante al menos 30 días en las matrices. Esto puede atribuirse a la funcionalización de las nanopartículas con moléculas de PEG, por lo que a futuras investigaciones se considera fundamental este paso para mantener la estabilidad coloidal de las nano suspensiones en las resinas de impresión en 3D.
- Los resultados de IR/FITR y PNMR -31 indican que la concentración relativa de fósforo disminuye en las matrices sólidas, sin embargo, se debe estudiar si es que esta molécula se libera al medio y evaluar su toxicidad.

- Los perfiles de liberación estudiados a partir de dispositivos que contenían AuNRs 2 y AuNRs 1 versus los que no contenían AuNRs arrojaron ser similares según el cálculo del factor de similitud F2. Esto indica que el mecanismo de liberación es el mismo para ambos, sin embargo, la velocidad de liberación es mayor para aquellos dispositivos con AuNRs, esto indica que la irradiación de estos dispositivos produce una primera liberación de niclosamida y se podría producir una segunda liberación asociada al swelling del dispositivo, esto se podría estudiar en futuras investigaciones. Los gráficos de los modelos cinéticos en función de los datos empíricos se pueden encontrar en el anexo 1.
- Se puede concluir que el peso molecular del polímero permite una liberación sin irradiación mayor que cuando se realizaron estudios de liberación sin irradiación de los dispositivos formulados a partir del PEGDA 250. Es por esto que se concluye que el peso molecular de los polímeros que conformen las matrices afectará al grado de reticulación de los dispositivos sólidos finales y por ende a la velocidad de liberación del fármaco.

Objetivo específico 3

Se propone el diseño de un dispositivo bicapa de las mismas dimensiones que los dispositivos monocapa (3x5mm) que contiene AuNRs 1 y AuNRs 2 en proporciones 50 y 50 % a partir de las proporciones indicadas por la matriz 6 con PEGDA 575. Este dispositivo fue sometido a estudios de liberación con el fin de observar una liberación controlada de la niclosamida. Adicionalmente se diseñó un dispositivo de dimensiones más grandes 10x5 mm y se evaluó su liberación bajo las mismas irradiaciones.

Estudios de liberación del dispositivo bicapa:

Se propuso la formulación de un dispositivo bicapa diseñado a partir de la Matriz 6 de PEGDA 575 cómo se puede observar en la Figura 36.

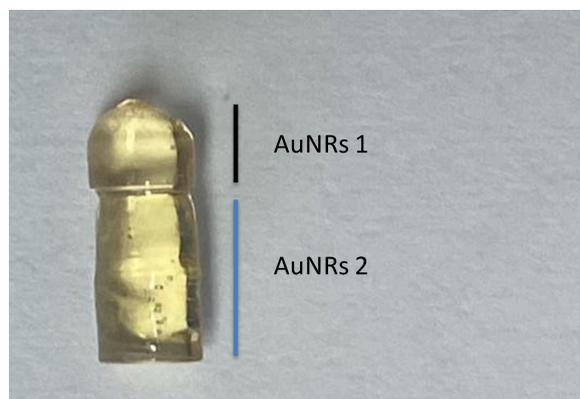


Figura 36. Imagen de los dispositivos bicapa con AuNRs 2 y AuNRs 1

Para evaluar la liberación controlada de niclosamida se sometieron los dispositivos a un estudio de liberación en donde se midió la concentración a diferentes tiempos:

- 1- Después de irradiación con láser de 808 nm 15 min
- 2- Después de irradiación con láser de 808 nm 15 min y 1064 nm 15 min.

Se compararon los datos obtenidos con un dispositivo bicapa que no fue irradiado como se puede observar en la Figura 37. Los resultados tras la primera irradiación de 808 indicaron que existe una primera liberación hasta alcanzar un porcentaje de liberación cercano al 1,3 %, sin embargo, cabe destacar que, los dispositivos no liberaron más que los dispositivos monocapa con AuNRs1 cuando estos fueron expuestos a 15 min de irradiación. Esto se podría atribuir a al volumen del impreso que contenían AuNRs 1, con respecto al dispositivo monocapa, la bicapa contenía la mitad del volumen original, al separarse en dos capas. Adicionalmente, la irradiación se realizó de manera vertical y no horizontal en la muestra, por

lo que la presencia de las capas con AuNRs2 que no interaccionan con el láser de 808, podrían estar interfiriendo con la interacción de las capas que sí contenían AuNRs 1 con el láser.

Cuando los dispositivos bicapa se sometieron a 15 min de irradiación a 808 nm y 15 min a 1064 nm se alcanzaron concentraciones similares de niclosamida respecto a los monocapa con AuNRs 2. El porcentaje de liberación de la bicapa tras 30 minutos de irradiación fue cercano al 4 %.

Esto podría indicar que un dispositivo bicapa formado por AuNRs 1 y AuNRs 2 es capaz de controlar la liberación de niclosamida en función del tiempo, respondiendo al estímulo de la irradiación a diferentes longitudes de onda.

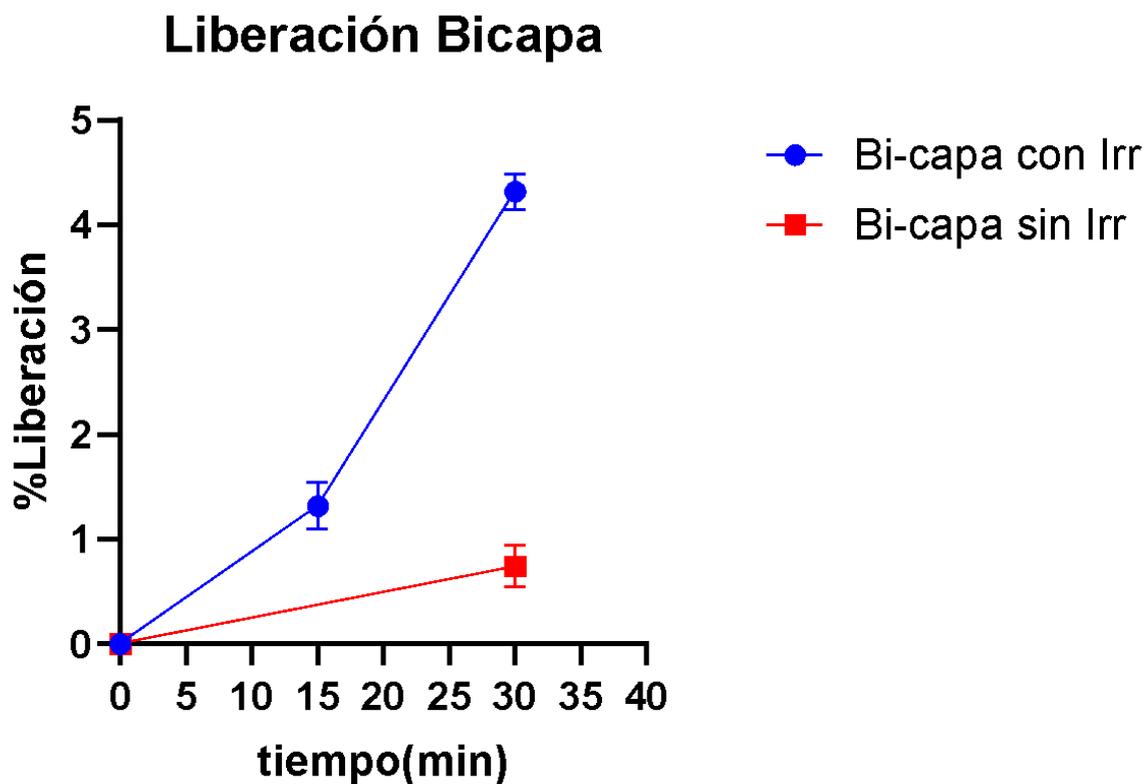


Figura 37. Liberación de niclosamida desde dispositivo bicapa tras la irradiación a 808 nm y 1064 nm

Control de la liberación:

Con el fin de entender mejor cómo es que la presencia de AuNRs en los materiales impresos es capaz de controlar la liberación del activo es que se realizó un cuadro comparativo de las

constantes de velocidad asociadas a cada perfil de liberación de los monocapas (Figura 34 y 35) como se puede observar en la Tabla 12. Las constantes comparadas corresponden a las constantes obtenidas con el ajuste de la ecuación Peppas-Sahlin.

Tabla 12. Comparación de constantes de difusión K1 y K2 para perfiles de liberación de dispositivos con irradiación AuNRs2, AuNRs1 sin Au y dispositivos sin irradiación.

K	AuNRs 2	AuNRs 1	Sin Au	Sin IRR
K1	2,458	3,209	1,914	0,300
K2	0, 3775	0,6243	0,3811	0,0075

Con respecto a las constantes K1 asociadas a mecanismos de difusión fickiana se observó que, con respecto a los dispositivos sin irradiación, estas constantes aumentaron de 0,3 a 1,9 cuando estos de dispositivos sin nanopartículas fueron sometidos a irradiación. Esto podría significar, que el aumento de la temperatura inducido por el láser fue capaz de contribuir a la difusión Fickiana ⁸⁸. Por otro lado, cuando los dispositivos con nanopartículas fueron irradiados aumentaron aún más la constante de difusión asociado a la contribución Fickiana. Esto podría significar una interacción entre las nanopartículas y las moléculas de niclosamida. Se plantea la hipótesis de que las moléculas de PEG ancladas a la superficie de los AuNRs contribuyen a la formación de un ambiente hidrofóbico que podría proteger a la molécula de niclosamida dentro de las matrices. Adicionalmente, esto explicaría la ausencia de visualización de cristales de niclosamida en los impresos con nanopartículas. En literatura, se ha descrito, que la niclosamida puede formar interacciones de tipo hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y van der Waals cuando interaccionan con moléculas biológicas como la pepsina y proteínas del suero. ^{69,89,90}

Por otro lado los valores de las K2 asociadas a mecanismos de difusión no fickianos aumentan de 0,0075 a 0,38 cuando los dispositivos son irradiados. Esto se podría explicar debido a que la acción del láser y la generación de calor podrían provocar un cambio en la temperatura de transición vítrea del polímero, de manera que se promueva la hidratación del dispositivo y el reordenamiento de las cadenas poliméricas, permitiendo así la difusión de niclosamida por contribuciones no fickianas. ⁹¹⁻⁹³

Conclusiones generales:

En conclusión, se comprueba que la incorporación de nanopartículas de oro de diferentes morfologías a matrices poliméricas para impresión en 3D, permite la liberación controlada de niclosamida desde dispositivos sólidos impresos en 3D cuando estos son expuestos a irradiación a longitudes de onda proporcionales al plasmón de cada nanosistema. De esta manera se aprueba la hipótesis planteada para este trabajo de tesis.

Se observó que de todas las matrices propuestas para impresión en 3D la que tuvo mayor éxito en cuanto a capacidad de impresión fue la matriz 6 con PEGDA 575 que estaba compuesta en un 90 % de PEGDA y 10 % de agua en donde se resuspendieron los nanosistemas. Además, cabe destacar que el peso molecular del polímero determinará la hidrofobicidad y el comportamiento elástico de cada matriz, por lo que los nanosistemas que se incorporen deben estar estabilizados mediante la funcionalización de moléculas a su superficie.

En los estudios de liberación, aquellos dispositivos que contenían AuNPs liberaron una mayor cantidad de niclosamida en casi todos los puntos en relación con aquellos dispositivos sin AuNRs. Sin embargo, el porcentaje de liberación sigue considerándose bajo, es por esto que, para futuros estudios, recomendaría variar la concentración de AuNRs con el fin de observar si existe una mayor liberación cuando aumenta la cantidad de nanopartículas en los dispositivos impresos.

Adicionalmente se plantea la nueva hipótesis de que las AuNPs funcionalizadas podrían estar interactuando con el activo de tal manera que su presencia afectará a la liberación de niclosamida por difusión cuando el dispositivo es expuesto a un medio acuoso.

La impresión en 3D por estereolitografía se representó como una herramienta prometedora a la hora de diseñar formulaciones farmacéuticas a base de reacciones de fotopolimerización. El uso de polímeros fotosensibles puede dar origen a dispositivos capaces de controlar la liberación de activos, sin embargo, el uso de fotoiniciadores es un desafío que aún sugiere más análisis, como pruebas de liberación de TPO y pruebas de citotoxicidad / *in vivo*, con el fin de evaluar la toxicidad en sistemas biológicos.

Finalmente se espera que estos resultados sean capaces de contribuir a la investigación científica de vanguardia en cuanto a formulaciones farmacéuticas innovadoras de liberación controlada y personalización de las terapias.

Referencias:

1. Menditto, E., Orlando, V., de Rosa, G., Minghetti, P., Musazzi, U., Cahir, C., Kurczewska-Michalak, M., Kardas, P., Costa, E., Sousa Lobo, J., & Almeida, I. (2020). Patient Centric Pharmaceutical Drug Product Design—The Impact on Medication Adherence. *Pharmaceutics*, 12(1), 44. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010044>
2. Seoane-Viaño, I., Trenfield, S. J., Basit, A. W. & Goyanes, A. Translating 3D printed pharmaceuticals: From hype to real-world clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev* **174**, 553–575 (2021).
3. Stewart, K. *et al.* Preference for pharmaceutical formulation and treatment process attributes. *Patient Prefer Adherence* **Volume 10**, 1385–1399 (2016).
4. Kotta, S., Nair, A. & Alsabeelah, N. 3D Printing Technology in Drug Delivery: Recent Progress and Application. *Curr Pharm Des* **24**, 5039–5048 (2018).
5. Beg, S., Almalki, W. H., Malik, A., Farhan, M., Aatif, M., Rahman, Z., Alruwaili, N. K., Alrobaian, M., Tarique, M., & Rahman, M. (2020). 3D printing for drug delivery and biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 25(9), 1668–1681. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.07.007>
6. Wang, B. *et al.* Recent advances in polymer-based drug delivery systems for local anesthetics. *Acta Biomater* **96**, 55–67 (2019).
7. Wen, H., Jung, H. & Li, X. Drug Delivery Approaches in Addressing Clinical Pharmacology-Related Issues: Opportunities and Challenges. *AAPS Journal* **17**, 1327–1340 (2015).
8. Bloomquist, C. J. *et al.* Controlling release from 3D printed medical devices using CLIP and drug-loaded liquid resins. *Journal of Controlled Release* **278**, 9–23 (2018).
9. Das, S. S., Bharadwaj, P., Bilal, M., Barani, M., Rahdar, A., Taboada, P., Bungau, S., & Kyzas, G. Z. (2020). Stimuli-Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery, Imaging, and Theragnosis. *Polymers*, 12(6), 1397. <https://doi.org/10.3390/polym12061397>
10. Xiang, J. *et al.* Near-infrared light-triggered drug release from UV-responsive diblock copolymer-coated upconversion nanoparticles with high monodispersity. *J Mater Chem B* **6**, 3531–3540 (2018).
11. Shrestha, B., Tang, L. & Romero, G. Nanoparticles-Mediated Combination Therapies for Cancer Treatment. *Adv Ther (Weinh)* **2**, (2019).
12. Tapia-Arellano, A. *et al.* The curvature of gold nanoparticles influences the exposure of amyloid- β and modulates its aggregation process. *Materials Science and Engineering: C* **128**, 112269 (2021).
13. Amina, S. J. & Guo, B. A review on the synthesis and functionalization of gold nanoparticles as a drug delivery vehicle. *International Journal of Nanomedicine* vol. 15 9823–9857 Preprint at <https://doi.org/10.2147/IJN.S279094> (2020).
14. Khan, K. U. *et al.* Overview of nanoparticulate strategies for solubility enhancement of poorly soluble drugs. *Life Sci* **291**, 120301 (2022).
15. Urrejola, M. C. *et al.* Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly) . *Int. J. Morphol* **36**, 1463–1471 (2018).

16. Flores-Rojas, G. G., López-Saucedo, F. & Bucio, E. Gamma-irradiation applied in the synthesis of metallic and organic nanoparticles: A short review. *Radiation Physics and Chemistry* **169**, 107962 (2020).
17. Anisuzzman, M., Komalla, V., Tarkistani, M. A. M. & Kayser, V. Anti-Tumor Activity of Novel Nimotuzumab-Functionalized Gold Nanoparticles as a Potential Immunotherapeutic Agent against Skin and Lung Cancers. *J Funct Biomater* **14**, (2023).
18. Wu, Y. *et al.* Emerging plasmonic nanoparticles and their assemblies for cancer radiotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* **194**, 114710 (2023).
19. Bansal, S. A., Kumar, V., Karimi, J., Singh, A. P. & Kumar, S. Role of gold nanoparticles in advanced biomedical applications. *Nanoscale Advances* vol. 2 3764–3787 Preprint at <https://doi.org/10.1039/d0na00472c> (2020).
20. Dheyab, M. A. *et al.* Gold nanoparticles-based photothermal therapy for breast cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **42**, 103312 (2023).
21. Donoso-González, O. *et al.* Functionalization of gold nanostars with cationic β -cyclodextrin-based polymer for drug co-loading and sers monitoring. *Pharmaceutics* **13**, 1–21 (2021).
22. Salazar Sandoval, S. *et al.* β -Cyclodextrin-Based Nanosponges Inclusion Compounds Associated with Gold Nanorods for Potential NIR-II Drug Delivery. *Pharmaceutics* **14**, 2206 (2022).
23. Bolaños, K. *et al.* Adsorption of bovine serum albumin on gold nanoprisms: interaction and effect of NIR irradiation on protein corona. *J Mater Chem B* **8**, 8644–8657 (2020).
24. Cao, J. *et al.* Recent Progress in NIR-II Contrast Agent for Biological Imaging. *Front Bioeng Biotechnol* **7**, (2020).
25. Campu, A., Craciun, A.-M., Focsan, M. & Astilean, S. Assessment of the photothermal conversion efficiencies of tunable gold bipyramids under irradiation by two laser lines in a NIR biological window. *Nanotechnology* **30**, 405701 (2019).
26. Jara-Guajardo, P. *et al.* Gold nanoparticles mediate improved detection of β -amyloid aggregates by fluorescence. *Nanomaterials* **10**, (2020).
27. Nejabat, M. *et al.* An Overview on Gold Nanorods as Versatile Nanoparticles in Cancer Therapy. *Journal of Controlled Release* **354**, 221–242 (2023).
28. Donoso-González, O. *et al.* Impact of Ligand Exchange on Gold Nanostars' Reshaping, Stabilization, Photothermal Efficiency, and Cell Viability. *ACS Appl Nano Mater* **7**, 1437–1449 (2024).
29. Bolaños, K., Kogan, M. J. & Araya, E. <p>Capping gold nanoparticles with albumin to improve their biomedical properties</p>. *Int J Nanomedicine* **Volume 14**, 6387–6406 (2019).
30. Meng, J. *et al.* Gold nanoparticles self-assemble on the thiol-functionalized fibrous silica microspheres to produce a robust catalyst. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **174**, 111190 (2023).
31. Di Cianni, W. *et al.* Polymer nanocomposites for plasmonics: In situ synthesis of gold nanoparticles after additive manufacturing. *Polym Test* **117**, 107869 (2023).

32. Shapovalov, V. V. *et al.* 3D-printed microfluidic system for the in situ diagnostics and screening of nanoparticles synthesis parameters. *Micro and Nano Engineering* **20**, 100224 (2023).
33. Karakurt, I., Aydođdu, A., Çıkırcı, S., Orozco, J. & Lin, L. Stereolithography (SLA) 3D printing of ascorbic acid loaded hydrogels: A controlled release study. *Int J Pharm* **584**, (2020).
34. Real, J. P. *et al.* 3D-Printed Gastroretentive Tablets Loaded with Niclosamide Nanocrystals by the Melting Solidification Printing Process (MESO-PP). *Pharmaceutics* **15**, (2023).
35. Borandeh, S., van Bochove, B., Teotia, A. & Seppälä, J. Polymeric drug delivery systems by additive manufacturing. *Adv Drug Deliv Rev* **173**, 349–373 (2021).
36. Yan, W. *et al.* Preparation of informative wafers (info-wafers) by combination of 3D printing, code design and photopolymerization. *Int J Pharm* **637**, 122877 (2023).
37. Aslam, A. *et al.* Fabrication of Stimuli-Responsive Quince/Mucin Co-Poly (Methacrylate) Hydrogel Matrices for the Controlled Delivery of Acyclovir Sodium: Design, Characterization and Toxicity Evaluation. *Pharmaceutics* **15**, (2023).
38. Tracy, T., Wu, L., Liu, X., Cheng, S. & Li, X. 3D printing: Innovative solutions for patients and pharmaceutical industry. *Int J Pharm* **631**, 122480 (2023).
39. Abad-Coronel, C., Pazán, D. P., Hidalgo, L. & Larriva Loyola, J. Comparative Analysis between 3D-Printed Models Designed with Generic and Dental-Specific Software. *Dent J (Basel)* **11**, (2023).
40. Ameduzzafar *et al.* 3D Printing Technology in Design of Pharmaceutical Products. *Curr Pharm Des* **24**, 5009–5018 (2019).
41. Melchels, F. P. W., Feijen, J., & Grijpma, D. W. (2010). A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*, 31(24), 6121–6130.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.050>
42. Raman, R. & Bashir, R. Stereolithographic 3D bioprinting for biomedical applications. in *Essentials of 3D Biofabrication and Translation* 89–121 (Elsevier Inc., 2015).
doi:10.1016/B978-0-12-800972-7.00006-2.
43. Tehfe, M. A., Louradour, F., Lalevée, J. & Fouassier, J. P. Photopolymerization reactions: On the way to a green and sustainable chemistry. *Applied Sciences (Switzerland)* **3**, 490–514 (2013).
44. Robles Martinez, P., Basit, A. W. & Gaisford, S. The history, developments and opportunities of stereolithography. in *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series* vol. 31 55–79 (Springer Verlag, 2018).
45. Wang, J., Goyanes, A., Gaisford, S. & Basit, A. W. Stereolithographic (SLA) 3D printing of oral modified-release dosage forms. *Int J Pharm* **503**, 207–212 (2016).
46. Lakkala, P., Munnangi, S. R., Bandari, S. & Repka, M. Additive manufacturing technologies with emphasis on stereolithography 3D printing in pharmaceutical and medical applications: A review. *Int J Pharm X* **5**, 100159 (2023).
47. Linares, V., Casas, M., Huwyler, J. & Caraballo, I. Stereolithographic 3D printing: Formulation design based on percolation thresholds. *J Drug Deliv Sci Technol* **90**, 105099 (2023).
48. Alafnan, A. *et al.* Development and Characterization of PEGDA Microneedles for Localized Drug Delivery of Gemcitabine to Treat Inflammatory Breast Cancer. *Materials* **15**, (2022).

49. Karakurt, I., Aydoğdu, A., Çıkrıkçı, S., Orozco, J. & Lin, L. Stereolithography (SLA) 3D printing of ascorbic acid loaded hydrogels: A controlled release study. *Int J Pharm* **584**, 119428 (2020).
50. Yadav, V. *et al.* 3D printed hollow microneedles array using stereolithography for efficient transdermal delivery of rifampicin. *Int J Pharm* **605**, 120815 (2021).
51. Jamróz, W., Szafraniec, J., Kurek, M. & Jachowicz, R. 3D Printing in Pharmaceutical and Medical Applications – Recent Achievements and Challenges. *Pharmaceutical Research* vol. 35 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2454-x> (2018).
52. Eiichi Goto, Tatsuaki Tagami, Koki Ogawa & Tetsuya Ozeki*. Fabrication of 3D-Printed Contact Lens Composed of Polyethylene Glycol Diacrylate for Controlled Release of Azithromycin. *Biol Pharm Bull* **Volume 46**, 1461–1467 (2023).
53. Madzarevic, M. *et al.* Optimization and prediction of ibuprofen release from 3D DLP printlets using artificial neural networks. *Pharmaceutics* **11**, (2019).
54. Vehse, M., Petersen, S., Sternberg, K., Schmitz, K. P. & Seitz, H. Drug delivery from poly(ethylene glycol) diacrylate scaffolds produced by DLC based micro-stereolithography. *Macromol Symp* **346**, 43–47 (2014).
55. Layani, M., Wang, X. & Magdassi, S. Novel Materials for 3D Printing by Photopolymerization. *Advanced Materials* vol. 30 Preprint at <https://doi.org/10.1002/adma.201706344> (2018).
56. Zeng, B. *et al.* Cytotoxic and cytocompatible comparison among seven photoinitiators-triggered polymers in different tissue cells. *Toxicology in Vitro* **72**, (2021).
57. Wang, S. *et al.* Biocompatibility and cytotoxicity of novel photoinitiator π -conjugated dithienophosphole derivatives and their triggered polymers. *Toxicology in Vitro* **63**, (2020).
58. Popal, M., Volk, J., Leyhausen, G. & Geurtsen, W. Cytotoxic and genotoxic potential of the type I photoinitiators BAPO and TPO on human oral keratinocytes and V79 fibroblasts. *Dental Materials* **34**, 1783–1796 (2018).
59. Wu, Y. P. *et al.* New acyl phosphine oxides as high-performance and low migration type I photoinitiators of radical polymerization. *Prog Org Coat* **168**, 106876 (2022).
60. Dumur, F. Recent advances on photobleachable visible light photoinitiators of polymerization. *Eur Polym J* **186**, 111874 (2023).
61. Bao, Y. Recent Trends in Advanced Photoinitiators for Vat Photopolymerization 3D Printing. *Macromol Rapid Commun* **43**, (2022).
62. Dietlin, C. *et al.* Photopolymerization upon LEDs: new photoinitiating systems and strategies. *Polym Chem* **6**, 3895–3912 (2015).
63. Goyanes, A., Robles Martinez, P., Buanz, A., Basit, A. W. & Gaisford, S. Effect of geometry on drug release from 3D printed tablets. *Int J Pharm* **494**, 657–663 (2015).
64. Feng, S. & Repka, M. A. Future Prospects Including Novel Polymeric Excipients for 3D Printing of Pharmaceutical and Biomedical Applications. in 273–286 (2024). doi:10.1007/978-3-031-46015-9_11.
65. Choudhury, D., Sharma, P. K., Suryanarayana Murty, U. & Banerjee, S. Stereolithography-assisted fabrication of 3D printed polymeric film for topical berberine delivery: in-vitro, ex-vivo and in-vivo investigations. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **74**, 1477–1488 (2022).

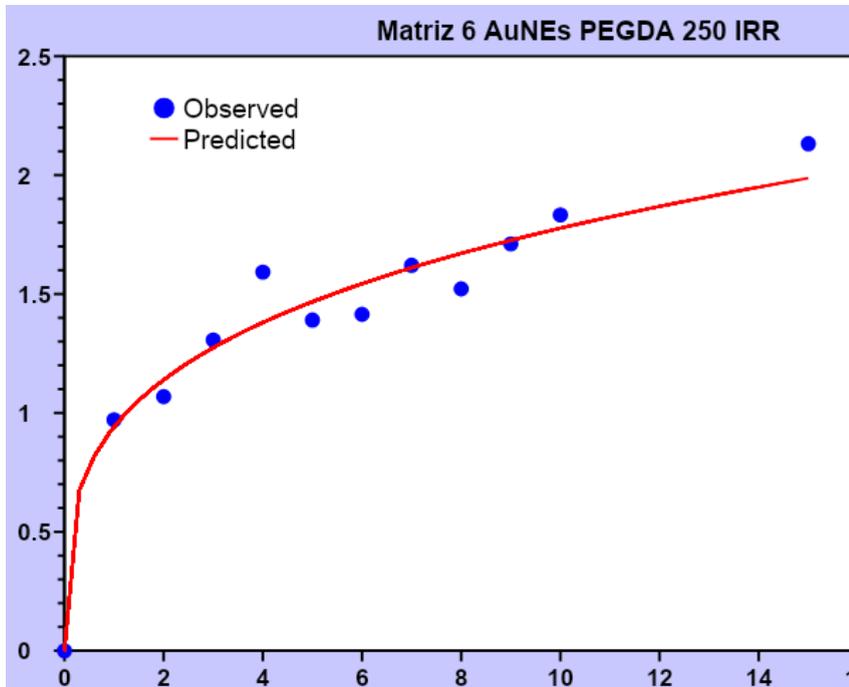
66. Okwuosa, T. C. *et al.* On demand manufacturing of patient-specific liquid capsules via co-ordinated 3D printing and liquid dispensing. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **118**, 134–143 (2018).
67. Smith, P. T. *et al.* Additive Manufacturing of Bovine Serum Albumin-Based Hydrogels and Bioplastics. *Biomacromolecules* **21**, 484–492 (2020).
68. Jara, M. O. & Williams III, R. O. The challenge of repurposing niclosamide: Considering pharmacokinetic parameters, routes of administration, and drug metabolism. *J Drug Deliv Sci Technol* **81**, 104187 (2023).
69. Barbosa, E. J., Löbenberg, R., de Araujo, G. L. B. & Bou-Chacra, N. A. Niclosamide repositioning for treating cancer: Challenges and nano-based drug delivery opportunities. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **141**, 58–69 (2019).
70. Kang, B. *et al.* Design, Synthesis, and Evaluation of Niclosamide Analogs as Therapeutic Agents for Enzalutamide-Resistant Prostate Cancer. *Pharmaceutics* **16**, 735 (2023).
71. Singh, S. *et al.* Niclosamide—A promising treatment for COVID-19. *Br J Pharmacol* **179**, 3250–3267 (2022).
72. Karimadom, B. R. & Kornweitz, H. Mechanism of producing metallic nanoparticles, with an emphasis on silver and gold nanoparticles, using bottom-up methods. *Molecules* vol. 26 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules26102968> (2021).
73. Gallardo-Toledo, E. *et al.* Intranasal administration of gold nanoparticles designed to target the central nervous system: Fabrication and comparison between nanospheres and nanoprisms. *Int J Pharm* **590**, (2020).
74. Rao Nagasarapu, M. & Mallikarjuna Rao, N. *DEVELOPMENT AND VALIDATION OF STABILITY INDICATING RP-HPLC AND UV-SPECTROSCOPY METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF NICLOSAMIDE IN PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS.* www.JGTPS.com (2018).
75. Zhang, Y. *et al.* DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS J* **12**, 263–271 (2010).
76. Costa, P. & Sousa Lobo, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **13**, 123–133 (2001).
77. Clogston, J. D. & Patri, A. K. Zeta Potential Measurement. in 63–70 (2011). doi:10.1007/978-1-60327-198-1_6.
78. Sanphui, P., Kumar, S. S. & Nangia, A. Pharmaceutical Cocrystals of Niclosamide. *Cryst Growth Des* **12**, 4588–4599 (2012).
79. Pistone, M. *et al.* Direct cyclodextrin-based powder extrusion 3D printing for one-step production of the BCS class II model drug niclosamide. *Drug Deliv Transl Res* **12**, 1895–1910 (2022).
80. Zhao, Z., Kuang, X., Yuan, C., Qi, H. J. & Fang, D. Hydrophilic/Hydrophobic Composite Shape-Shifting Structures. *ACS Appl Mater Interfaces* **10**, 19932–19939 (2018).
81. Kim, M. & Cha, C. Integrative control of mechanical and degradation properties of in situ crosslinkable polyamine-based hydrogels for dual-mode drug release kinetics. *Polymer (Guildf)* **145**, 272–280 (2018).

82. Tseng, H.-C. A revisit of generalized Newtonian fluids. *J Rheol (N Y N Y)* **64**, 493–504 (2020).
83. Wu, I. Y., Bala, S., Škalko-Basnet, N. & di Cagno, M. P. Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **138**, 105026 (2019).
84. Guo, L. *et al.* Interaction Behavior between Niclosamide and Pepsin Determined by Spectroscopic and Docking Methods. *J Fluoresc* **25**, 1681–1693 (2015).
85. Marcos Luciano Bruschi. Mathematical models of drug release. in *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (ed. Marcos Luciano Bruschi) 63–86 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9.
86. Sáez, V., Hernández, E., Sanz Angulo, L., Públicas Beurco, O. & España, B. *MECANISMOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS DESDE MATERIALES POLÍMEROS*.
87. Shah, V. P., Tsong, Y., Sathe, P. & Liu, J. In Vitro Dissolution Profile Comparison—Statistics and Analysis of the Similarity Factor, f₂. *Pharm Res* **15**, 889–896 (1998).
88. Gupta, A. *et al.* Diffusion Kinetics of Vitamin B12 from Alginate and Poly(vinyl acetate) Based Gel Scaffolds for Targeted Drug Delivery. *Journal of Macromolecular Science, Part B* **59**, 713–730 (2020).
89. Maltas, E. Binding interactions of niclosamide with serum proteins. *J Food Drug Anal* **22**, 549–555 (2014).
90. Bhushan, B. *et al.* Bionanotherapeutics: Niclosamide encapsulated albumin nanoparticles as a novel drug delivery system for cancer therapy. *RSC Adv* **5**, 12078–12086 (2015).
91. Kalakkunnath, S., Kalika, D. S., Lin, H. & Freeman, B. D. Viscoelastic characteristics of UV polymerized poly(ethylene glycol) diacrylate networks with varying extents of crosslinking. *J Polym Sci B Polym Phys* **44**, 2058–2070 (2006).
92. Keim, T. & Gall, K. Synthesis, characterization, and cyclic stress-influenced degradation of a poly(ethylene glycol)-based poly(beta-amino ester). *J Biomed Mater Res A* **92**, 702–711 (2010).
93. R.S, P., Bomb, K., Srivastava, R. & Bandyopadhyaya, R. Dual drug delivery of curcumin and niclosamide using PLGA nanoparticles for improved therapeutic effect on breast cancer cells. *Journal of Polymer Research* **27**, (2020).

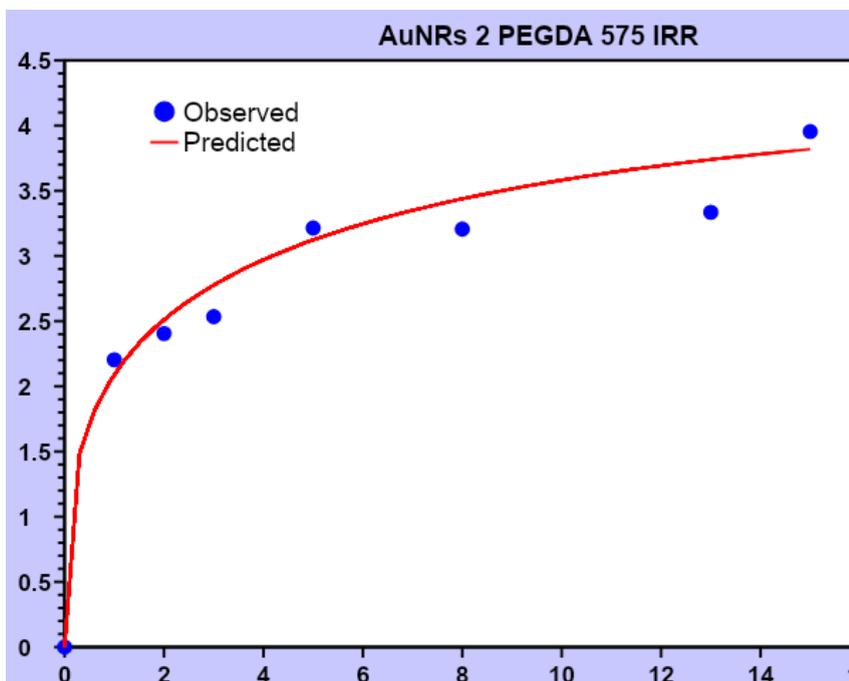
Anexo 1:

Gráficos de modelos cinéticos en función de datos empíricos.

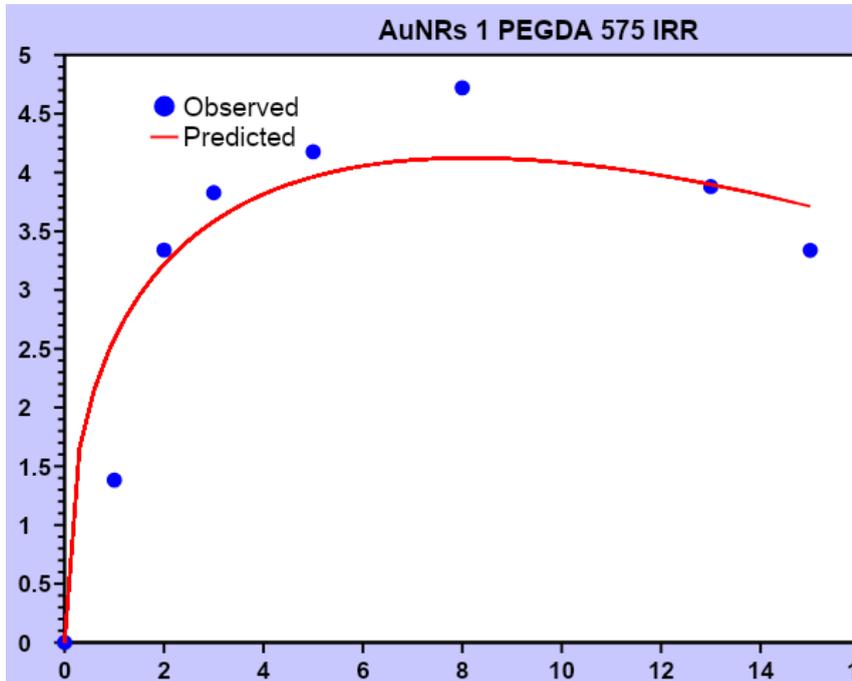
1. Ajuste a modelo cinético Korsmeyer -Peppas Matriz 6 AuNEs PEGDA 250 con irradiación



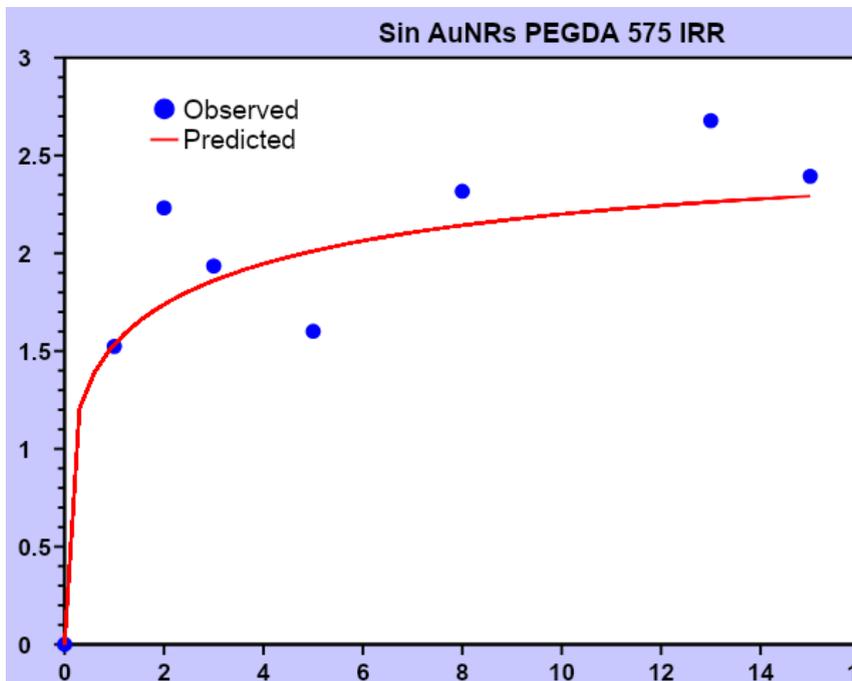
2. Ajuste a modelo cinético Peppas- Sahlin matriz 6 AuNRs 2 PEGDA 575 con Irradiación.



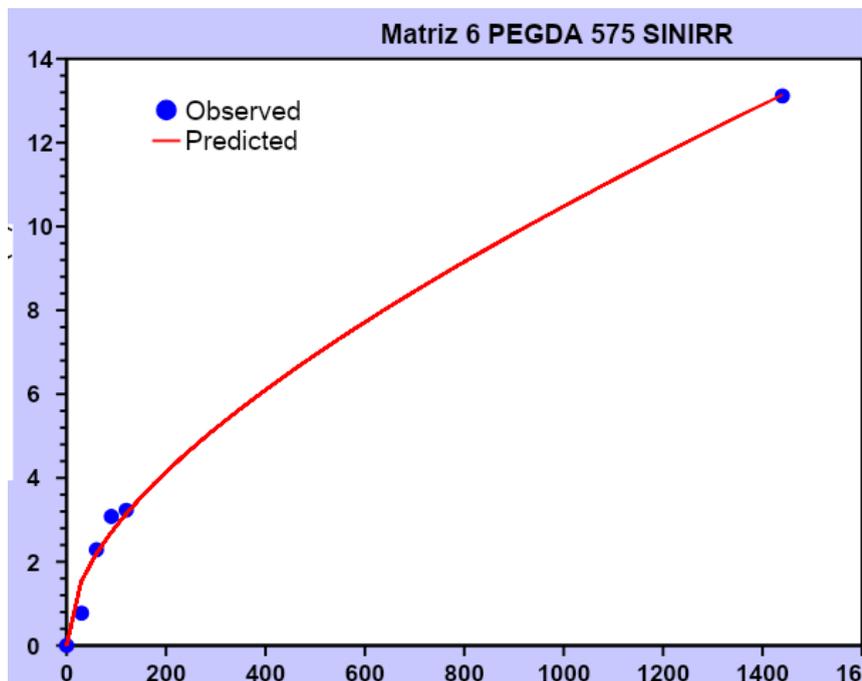
3. Ajuste a modelo cinético Peppas-Sahlin Matriz 6 AuNRs 1 PEGDA 575 con Irradiación.



4. Ajuste a modelo cinético Peppas- Sahlin Matriz 6 Sin AuNRs PEGDA 575 con Irradiación.



5. Ajuste cinético Peppas-Sahlin Matriz 6 PEGDA 575 sin irradiación.



Anexo 2: Dispositivo Bi-capa 10x5 mm

Se formuló un dispositivo mas grande con el fin de evaluar si el tamaño de la impresión afecta en la liberación de niclosamida como se puede observar en la figura 38

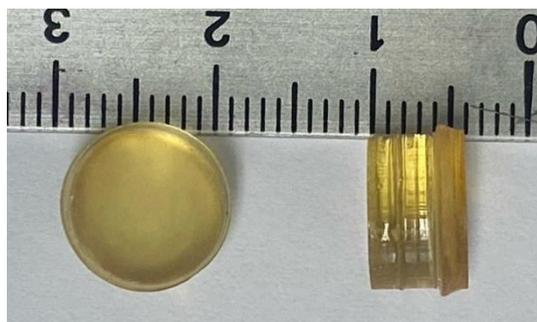


Figura 38 Dispositivos bicapa de 500 mg

El peso promedio de estas impresiones fue de 500 mg. Al igual que el dispositivo estándar, se sometió a irradiación a dos longitudes de onda 808 y 1064 nm por 15 minutos cada una. Los resultados arrojaron una pobre liberación desde el dispositivo durante los 30 minutos que duró el experimento. El máximo de porcentaje de liberación con respecto a la cantidad de

niclosamida que poseía este dispositivo fue cercano al 0.1 % como se puede apreciar en la figura 37.

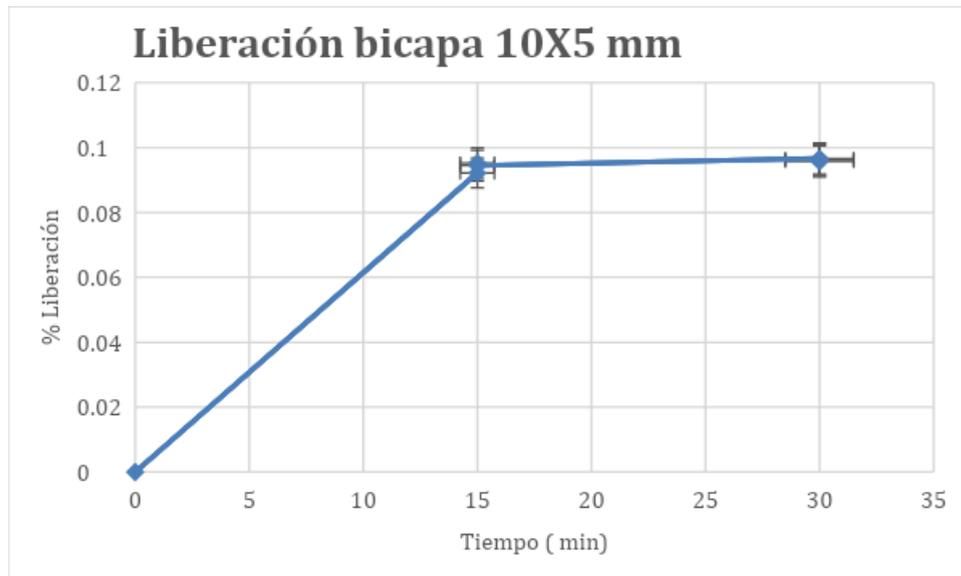


Figura 39. Perfil de Liberación niclosamida desde dispositivo bicapa de 10 x 5 mm sometido a irradiación a 808 y 1064 nm por 30 minutos.

Este resultado sugiere que la liberación de niclosamida se ve afectada por el tamaño del dispositivo impreso en 3D. Esto podría atribuirse al área superficial del dispositivo que entra en contacto con el medio de disolución. En consecuencia, los dispositivos más grandes y pesados necesitarán más tiempo para que el fármaco difunda desde la matriz hacia el exterior. Esto se debe a que estos dispositivos tardarán más en hincharse y absorber agua, prolongando el proceso de liberación de niclosamida.