Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales

Desarrollo de un prototipo de hidrogel mediante el uso de impresión 3D para la liberación de sustancias biológicamente activas

Proyecto final de graduación para optar por el título de Ingeniero en Materiales con el grado académico de Licenciatura

Realizado por: Jose Andrés Garro Garita

Profesor guía: Dr. Benito Stradi Granados
Profesor lector: Lic. Fernando Dittel Meza
Profesor lector: M. Sc. Ricardo Esquivel Isern
Asesora industrial: Ing. Daniela Zúñiga River

Cartago, noviembre 2025

Carrera Acreditada por la Agencia de Acreditación de Programas de Ingeniería y Arquitectura





Resumen

Este proyecto fue desarrollado en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC) del Centro Nacional de Alta Tecnología (CeNAT) de Costa Rica. Consistió en el desarrollo de un prototipo de hidrogel a base de gelatina funcionalizada mediante impresión 3D para la liberación controlada de extracto de acerola. Se llevaron a cabo pruebas de curado variando la concentración de riboflavina y de l-arginina para obtener el tiempo de curado y se determinaron los parámetros óptimos para la impresión 3D. Se caracterizó el grado de funcionalización y la estructura química de la gelatina mediante resonancia magnética nuclear (H-NMR) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Se midieron las propiedades viscoelásticas y se llevaron a cabo pruebas de grado de hinchamiento y de liberación controlada de extracto de acerola. Por último, se observó la morfología del hidrogel mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se logró determinar un espesor de capa 50 μm de y un tiempo de exposición por capa de 200 s como parámetros óptimos de impresión 3D. La caracterización mediante H-NMR confirmó la funcionalización de la gelatina luego de la metacrilación y con ayuda del FTIR se confirmó el entrecruzamiento y la capacidad de cargar el hidrogel con extracto de acerola. Mediante El ensayo de liberación controlada se determinó una liberación gobernada por difusión de Fick mediante el ajuste con el modelo de Korsmeyer-Peppas (R^2=0,9858, K_{KP} =0,1748). Los resultados obtenidos indican que el hidrogel producido tiene potencial para la liberación controlada de fármacos.

Palabras clave: gelatina, riboflavina, impresión 3D, fotopolimerización, liberación controlada

Abstract

This Project was developed at National Nanotechnology Laboratory (LANOTEC) of the National High Technology Center (CeNAT) of Costa Rica. It consisted in the development of a 3D printed gelatin-based hydrogel prototype destined for sustained delivery of acerole extract. Curing tests were carried out varying the concentration of riboflavin and l-arginine to determine curing time and optimal printing parameters. The functionalization and chemical structure of gelatin were determined by proton nuclear magnetic resonance (H-NMR) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Viscoelastic properties were measured, and swelling degree and sustained delivery tests were carried out. Finally, the morphology of the hydrogel was observed using scanning electron microscopy (SEM). An optimal layer thickness of 50 μm and an exposure time per layer of 200 s were determined as the best 3D printing parameters. Characterization by ^{1}H-NMR confirmed the successful functionalization of gelatin after methacrylation, while FTIR analysis verified crosslinking and the hydrogel's ability to load acerola extract. The controlled release test revealed a Fickian diffusion–governed mechanism, as described by the Korsmeyer–Peppas model (R^2 = 0.9858, K_{kp} = 0.1748). The obtained results indicate that the produced hydrogel has strong potential for controlled drug delivery applications.

Keywords: gelatin, riboflavin, 3D printing, photopolymerization, sustained delivery

ACTA DE ENTREGA DEL INFORME FINAL

DE LA PRÁCTICA DIRIGIDA

Se certifica que se ha recibido el Informe Final de la Práctica Dirigida, realizada por el(la) estudiante Jose Andrés Garro Garita, carné 2019039803, la cual se titula: "Desarrollo de un prototipo de hidrogel mediante el uso de impresión 3D para la liberación de sustancias biológicamente activas" y que se realizó en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología, ubicado en Pavas, San José, en el Segundo Semestre de 2025.

La Práctica Dirigida es un requisito académico del Programa de Licenciatura en Ingeniería en Materiales de la Escuela de en Ciencia e Ingeniería en Materiales del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Este documento ha sido declarado:

Públicos [X] Confidenciales [ ]

Dr. Benito A. Stradi Granados
Profesor Guía

Jose Andrés Garro Garita
Estudiante

M.Sc. Ricardo Esquivel Isern
Profesor lector

Lic. Fernando Dittel Meza
Profesor lector

M.Sc. Ricardo Esquivel Isern
Director Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales

Cartago, noviembre 2025

CONSTANCIA DE DEFENSA PUBLICA DEL
PROYECTO FINAL DE GRADUACIÓN

El presente Proyecto Final de Graduación titulado "Desarrollo de un prototipo de hidrogel mediante el uso de impresión 3D para la liberación de sustancias biológicamente activas" y realizado en conjunto con el Laboratorio Nacional de Nanotecnología, durante el Segundo Semestre de 2025, ha sido defendido, ante el Tribunal Examinador integrado por los profesores Benito Stradi Granados, Ricardo Esquivel Isern y Fernando Dittel Meza; como requisito para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Materiales de la Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales, del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Este documento y su defensa ante el Tribunal Examinador han sido declarados:

Públicos [X] Confidenciales [ ]

Dr. Benito A. Stradi Granados
Profesor Guía

Jose Andrés Garro Garita
Estudiante

M. Sc. Ricardo Esquivel Isern
Profesor lector

Lic. Fernando Dittel Meza
Profesor lector

M. Sc. Ricardo Esquivel Isern
Director Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales

Cartago, noviembre 2025

Carta de Entendimiento

Señores

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Biblioteca José Figueres Ferrer

Yo Jose Andrés Garro Garita, carné 2019039803, autorizo (X) no autorizo () a la Biblioteca José Figueres Ferrer del Instituto Tecnológico de Costa Rica disponer del Trabajo Final realizado por mi persona, con el título "Desarrollo de un prototipo de hidrogel mediante el uso de impresión 3D para la liberación de sustancias biológicamente activas" para ser ubicado en el Repositorio Institucional y Catálogo SIBITEC para ser accesado a través de la red Internet.

Firma del estudiante

Cédula: 118200452

Índice de contenido

1. Introducción 13

1.1. Identificación de la empresa 13

1.2. Justificación del estudio 13

1.3. Impacto socioambiental 14

1.4. Objetivos 14

1.4.1. Objetivo General 14

1.4.2. Objetivos Específicos 14

2. Marco Teórico 15

2.1. Gelatina 15

2.1.1. Estructura química 15

2.1.2. Tipos de gelatina 16

2.1.3. Propiedades de la gelatina 17

2.2. Síntesis de gelatina funcionalizada 17

2.2.1. Metacrilación 17

2.2.2. Propiedades de la gelatina metacrilada en hidrogeles 19

2.3. Fotopolimerización 21

2.3.1. Fotopolimerización 21

2.3.2. Fotoiniciadores 22

2.4. Impresión 3D 27

2.4.1. Estereolitografía (SLA) 27

2.5. Sistemas de administración de fármacos 29

2.5.1. Liberación controlada de fármacos 29

3. Metodología 36
3.1. Metacrilación de gelatina 36
3.2. Preparación de la tinta 36
3.3. Pruebas de curado 36
3.4. Impresión de estructuras 3D 37
3.4.1. Diseño de estructuras en CAD 37
3.4.2. Impresión 3D 37
3.5. Caracterización fisicoquímica 37
3.5.1. FTIR 37
3.5.1. Resonancia magnética nuclear (H-NMR) 38
3.5.2. Propiedades reológicas 38
3.5.3. Grado de hinchamiento 38
3.5.4. Microscopía electrónica de barrido 39
3.5.5. Liberación controlada *in vitro* 39
4. Resultados 40
4.1. FTIR 40
4.2. H-NMR 42
4.3. Curado e impresión 3D 43
4.3.1. Efecto de la concentración de riboflavina en el tiempo de curado 43
4.3.2. Efecto de la concentración de L-arginina en el tiempo de curado 45
4.3.3. Prueba de impresión 3D 45
4.4. Propiedades reológicas 48
4.5. Grado de hinchamiento 49
4.6. Liberación controlada 50
4.7. Microscopía electrónica de barrido 52

4.8. Análisis de costos 53
4.8.1. Metacrilación de gelatina 53
5. Conclusiones 54
6. Referencias bibliográficas 56
7. Anexos 63
7.1. Protocolo de metacrilación 63
7.2. Protocolo de impresión 3D 65
7.3. Protocolo de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier 67
7.4. H-NMR 69
7.5. Grado de hinchamiento 71
7.5.1. Protocolo para grado de hinchamiento 71
7.5.2. Datos experimentales para grado de hinchamiento 71
7.6. Liberación controlada 72
7.6.1. Datos experimentales para ensayo de liberación controlada 72
7.7. Microscopía electrónica de barrido 76
7.8. Cálculo de costos 77

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Fragmento de la estructura molecular de la gelatina [Elaboración propia]. 16

Figura 2. Esquema de reacción para la metacrilación de gelatina [11]. 18

Figura 3. Esquema para el entrecruzamiento del hidrogel mediante fotopolimerización [28] 22

Figura 4. Esquemas de reacción para fotoiniciadores del tipo I y II [29] 23

Tabla 1. Comparativa de diferentes fotoiniciadores solubles en agua [32]. 24

Figura 5. Estructura molecular y espectro de absorción de luz para riboflavina [39]. 26

Figura 6. Componentes de una impresora SLA: 1-parte impresa, 2-resina líquida, 3-plataforma móvil, 4-fuente de luz, 5-espejo de escaneo XY, 6-láser, 7-tanque de resina, 8-ventana, elevación en dirección Z [44] 28

Figura 7. Comparación de la precisión entre SLA y otras tecnologías de impresión 3D [44]. 29

Figura 8. Perfiles de cinética de liberación de fármacos [50]. 31

Figura 9. Esquema para la incorporación de fármacos. (A) Métodos de incorporación. (B) Métodos de liberación [53] 33

Tabla 2. Especificaciones técnicas para la impresora Anycubic Photon Mono X. 37

Figura 10. Espectro FTIR para gelatina (curva celeste) y gelatina funcionalizada (curva roja). . 40

Figura 11. Espectro FTIR para el hidrogel de gelatina funcionalizada (curva celeste), extracto de acerola (curva amarilla) y para el hidrogel cargado con extracto de acerola a una concentración de 1 mg/ml. 41

Figura 12. Espectro H-NMR para gelatina. 42

Figura 13. Espectro H-NMR para gelatina funcionalizada. 43

Tabla 3. Efecto de la concentración de riboflavina en el tiempo de curado para hidrogeles de gelatina funcionalizada (gelatina funcionalizada al 10% m/v en PBS y L-arginina al 10% m/m). 44

Figura 14. Hidrogel con riboflavina 0.2% m/m antes y después de curar bajo exposición a una longitud de onda de 405 nm. (A) Al inicio. (B) Luego de 5 minutos. (C) Luego de 30 minutos. 44

Tabla 4. Efecto de la concentración de L-arginina en el tiempo de curado para hidrogeles de gelatina funcionalizada (gelatina funcionalizada al 10% m/v en PBS y riboflavina al 0.2% m/m). 45

Figura 16. Hidrogeles de gelatina funcionalizada (10% m/v), riboflavina (0,2% m/m) y L-arginina (10% m/m) cargados con extracto de acerola (1 mg/ml) 46

Figura 17. Hidrogel fabricado mediante impresión 3D. (A) Recién impreso. (B) 24 h después del post curado. (C) En equilibrio de hinchamiento. 47

Tabla 5. Dimensiones promedio para los hidrogeles fabricados mediante impresión 3D. 48

Figura 19. Análisis reológico de barrido de amplitud a una frecuencia angular de 1 rad/s para el hidrogel de gelatina funcionalizada 49

Figura 20. Grado de hinchamiento para hidrogel de gelatina funcionalizada 50

Figura 21. Perfil de liberación para el hidrogel cargado con extracto de acerola. 51

Tabla 6. Parámetros de ajuste de distintos modelos matemáticos para el perfil de liberación de extracto de acerola. 51

Figura 22. Morfología del hidrogel de gelatina funcionalizada fabricado mediante impresión 3D. 52

Tabla 7. Desglose de costos para la metacrilación de gelatina. 53

Tabla 8. Desglose de costos de la resina líquida para impresión 3D. 53

Figura A1. Membrana de diálisis en plantilla eléctrica 64

Figura A2. Selección de parámetros de impresión. 66

Figura A3. Posición del brazo metálico durante la recolección de fondo. 67

Figura A4. Posición del brazo durante la medición y luego de utilizar el equipo 68

..... 69

Figura A5. Tubo de NMR en el holder. 69

Tabla A1. Valores de masa para la determinación del grado de hinchamiento 71

Tabla A2. Valores de absorbancia para la determinación del perfil de liberación para el extracto de acerola a una concentración de 1 mg/ml 72
Figura A6. Curva de calibración para determinar la concentración del analito..... 73
..... 73
Figura A7. Modelo de ajuste de orden cero 73
..... 74
Figura A8. Modelo de ajuste de primer orden 74
..... 74
Figura A9. Modelo de ajuste de Higuchi 74
..... 75
Figura A10. Modelo de ajuste de Korsmeyer-Peppas 75
Tabla A6. Costo de materiales asociados al protocolo de metacrilación..... 77
Tabla A7. Costo de materiales asociados a la producción de la resina líquida. 77

1. Introducción

1.1. Identificación de la empresa

El Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC), adscrito al Centro Nacional de Alta Tecnología (CeNAT) es una institución dedicada al desarrollo e innovación en el campo de la nanotecnología. Es una organización dedicada a la investigación científica y a la colaboración con el sector industrial de Costa Rica.

LANOTEC tiene la misión de ser un centro de investigación con altos estándares científicos mediante la investigación y desarrollo de tecnologías en conjunto con el sector público y privado contribuyendo con la mejora de productos y procesos en el marco de innovación y desarrollo.

Tiene como visión ser un laboratorio de alto impacto económico a nivel nacional e internacional que aporte a la generación de conocimiento en nanobiotecnología, convirtiéndose en líder en el fortalecimiento del desarrollo competitivo en el área, además de servir como líder en el fortalecimiento del desarrollo competitivo y articulación intersectorial.

1.2. Justificación del estudio

Los sistemas de administración de fármacos juegan un papel crucial para una dosificación segura y eficiente. El uso de sistemas de liberación tradicionales presenta varias limitaciones: un control limitado sobre la tasa de liberación del medicamento, dificultad para adaptarse a las necesidades específicas de un paciente y un uso ineficiente del principio activo.

Existen alternativas viables respecto al control de la tasa de liberación del fármaco, la posibilidad de preparar vehículos multifuncionales y el tratamiento personalizado, entre ellas se encuentra la impresión 3D de resina, sin embargo, el uso de fotoiniciadores sintéticos es una limitante actual en el área de aplicaciones biomédicas debido a su toxicidad. Este proyecto pretende producir un prototipo de hidrogel mediante impresión 3D de procesamiento de luz digital a base de gelatina funcionalizada para la liberación de sustancias biológicamente activas, utilizando un sistema de fotoiniciación biobabasado con riboflavina.

1.3. Impacto socioambiental

Desde el punto de vista social este proyecto contribuye al desarrollo y mejora de la tecnología de impresión 3D en aplicaciones biomédicas planteando soluciones que podrían llegar a ser de gran beneficio para el tratamiento de heridas crónicas que requieran tratamiento mediante la liberación prolongada de fármacos. Actualmente la gelatina es un biomaterial con mucho potencial en diversas aplicaciones biomédicas, sin embargo, el uso de fotoiniciadores sintéticos que pueden llegar a tener efectos nocivos para la salud limita su implementación, por lo que el reemplazo de estos reactivos por materiales de origen natural como la riboflavina es necesario para obtener vehículos para la liberación controlada de fármacos libre de compuestos sintéticos nocivos que permita dar el paso de investigación hacia el planteamiento de soluciones tangibles que puedan convertirse en productos o tratamientos clínicos.

El mercado de tecnologías de impresión 3D se encuentra en constante crecimiento, lo que implica un aumento en el uso de resinas termoestables derivadas del petróleo, contribuyendo a la generación de desechos plásticos, por lo que existe una necesidad de plantear alternativas sostenibles con el medio ambiente [1]. Los materiales biobasados como la gelatina y la sustitución de fotoiniciadores sintéticos por materiales de origen natural impacta positivamente la sostenibilidad del proceso de fabricación de dispositivos médicos mediante impresión 3D, sobre todo debido a que los fotoiniciadores y resinas sintéticas representan un daño al medio ambiente, ya que durante su síntesis y manejo de desechos luego de su uso se generan subproductos tóxicos. El uso de materiales de origen natural está alineado con principios de química verde y sostenibilidad, promoviendo procesos más limpios y respetuosos con el medio ambiente, lo cual se traduce en una menor huella ecológica en la producción de dispositivos médicos mediante tecnologías de impresión 3D.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Desarrollar una matriz de hidrogel mediante el uso de impresión 3D para la liberación controlada de sustancias biológicamente activas.

1.4.2. Objetivos Específicos

1. Establecer un protocolo detallado y reproducible para la formulación del hidrogel

2. Determinar el tiempo de curado del hidrogel para estructuras generadas con impresión 3D
3. Analizar propiedades del hidrogel mediante la caracterización fisicoquímica y reológica.
4. Estimar los costos de producción para la geometría utilizada

2. Marco Teórico

2.1. Gelatina

2.1.1. Estructura química

La gelatina es un polímero natural derivado de la degradación térmica o hidrolisis enzimática del colágeno, disponible en huesos, cartílagos, tendones, ligamentos, entre otros tejidos animales, lo cual hace que tenga propiedades únicas en el campo de aplicaciones biomédicas, ya que la gelatina tiene una estructura similar a la matriz extracelular y en su estructura la gelatina contiene la secuencia peptídica arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), que promueve la adhesión, proliferación y diferenciación celular, lo cual lo hace un material apto [2].

Tiene una composición de 25,2% oxígeno, 6,8% hidrógeno, 50,5% carbono y 17% nitrógeno en porcentaje m/m y está constituida principalmente por aminoácidos, siendo la glicina, prolina e hidroxiprolina los más abundantes [2], [3]. Su estructura corresponde a una proteína lineal de distintas cadenas polipépticas con cadenas alfa, beta y gamma y con un peso molecular entre 15,000-250,000 g/mol, cuya composición de aminoácidos depende principalmente del colágeno de partida y del método de extracción [3] Estas cadenas polipépticas se suelen acomodar en una triple hélice donde la gelatina se estabiliza mediante la formación de enlaces entre los átomos de nitrógeno y oxígeno, mientras que las cadenas interaccionan con puentes de hidrógeno [4], [5]. La Figura 1 ilustra la estructura molecular de la gelatina.

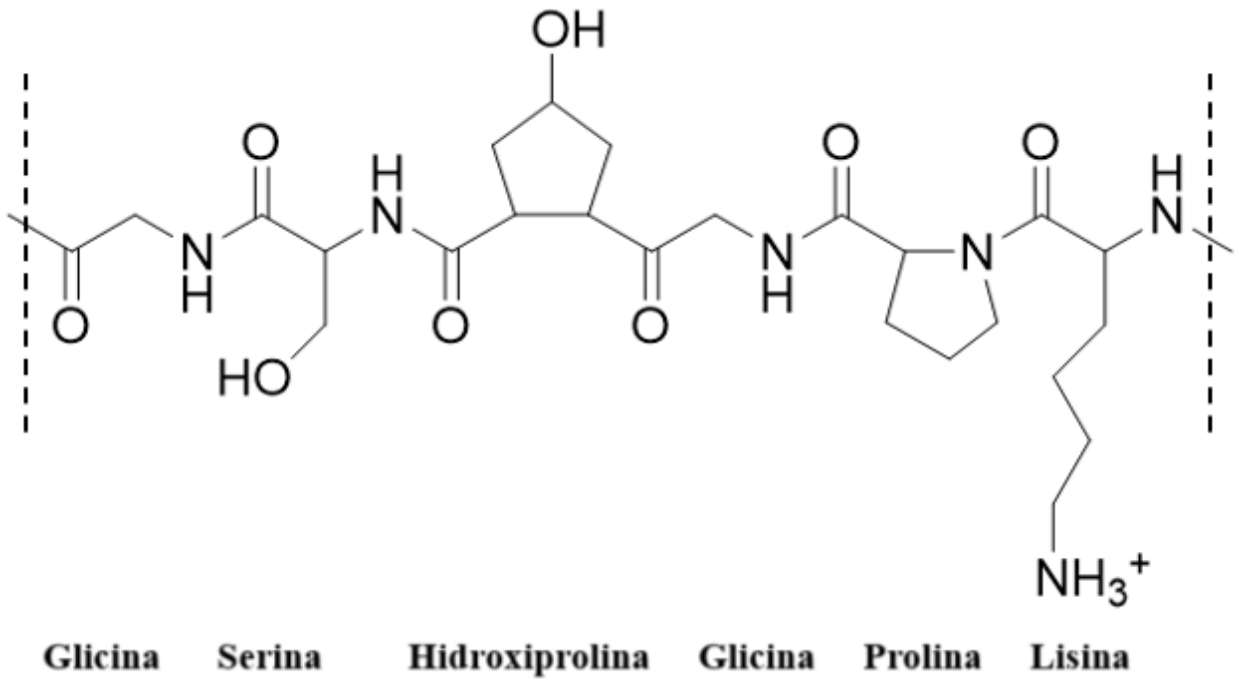


Figura 1. Fragmento de la estructura molecular de la gelatina [Elaboración propia].

El proceso de extracción a partir del colágeno influye en las propiedades fisicoquímicas de la gelatina consta de varias etapas, comenzando por una limpieza para reducir el contenido de grasa y proteínas no deseadas, seguido del pretratamiento. El pretratamiento aplicado depende del origen del colágeno e influye en las propiedades finales de la gelatina. En este proceso se sumerge el colágeno durante un periodo de tiempo establecido en una solución de ácido clorhídrico, (HCl) pH=1,5, para el tratamiento ácido aplicado al colágeno porcino, o en carbonato de sodio, ($CaCO_3$) pH>7, para el tratamiento alcalino, que se aplica al colágeno de origen bovino [4].

2.1.2. Tipos de gelatina

La gelatina se puede clasificar respecto a su origen en tipo A y B. La gelatina tipo A con un punto isoeléctrico entre 6 y 9, obtenida mediante el tratamiento ácido del colágeno de piel de cerdo; mientras que la gelatina tipo B, que tiene su punto isoeléctrico entre 4 y 5, se extrae del colágeno bovino y se obtiene a través del tratamiento alcalino [2]. En un estudio de Bae *et al*. se desarrollaron hidrogeles a partir de gelatina funcionalizada utilizando ambos tipos, donde hallaron

que la gelatina tipo B presentó un mayor grado de metacrilación y, por lo tanto, mejores propiedades debido a que hay más entrecruzamiento entre las cadenas de gelatina [6].

2.1.3. Propiedades de la gelatina

2.1.3.1. Punto isoeléctrico

Esta propiedad corresponde al valor de pH donde las cadenas de gelatina adquieren una carga neta eléctrica igual a cero debido al equilibrio entre cargas positivas y negativas, modificando las propiedades fisicoquímicas de la gelatina, como el grado de hinchamiento, solubilidad y la funcionalidad [7]. Por debajo del punto isoélectrico los grupos amino se protonan reduciendo su nucleoficilidad, lo que provoca que pierdan la capacidad de donar electrones, evitando que reaccionen con el anhidro metacrílico [8]. El punto isoeléctrico es una propiedad relevante durante la metacrilación de la gelatina.

2.1.3.2. Entrecruzamiento reversible

El entrecruzamiento físico de los grupos funcionales unidos por enlaces de hidrógeno no es estable a la temperatura fisiológica (36,4°C), lo cual limita el uso de gelatina en ingeniería de tejidos y administración de fármacos [2]. La temperatura de gelificación de la gelatina se encuentra a 40°C aproximadamente, donde las cadenas de su estructura están desordenadas y conforme la temperatura disminuye se reacomodan en una triple hélice siendo estabilizadas por enlaces de hidrógenos, solidificando la gelatina en un proceso reversible [3]. La gelatina entrecruzada físicamente tiende a ser muy frágil y a romperse fácilmente, lo que limita su manipulación [9]. Tomando en cuenta lo anterior, existen alternativas para producir un entrecruzamiento químico que mejore la estabilidad térmica y sus propiedades mecánicas, entre las cuales se encuentra la metacrilación de gelatina.

2.2. Síntesis de gelatina funcionalizada

2.2.1. Metacrilación

La síntesis de gelatina funcionalizada (GelMA, por sus siglas en inglés) con anhidrido metacrílico se da mediante la reacción de la gelatina con anhídrido metacrílico (AM), que da lugar a la unión de grupos metacrilato con los grupos hidroxilo y aminas primarias presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos (lisina, arginina, glutamina y asparagina), obteniendo un material

que se puede fotopolimerizar mediante la formación de enlaces covalentes en presencia de un fotoiniciador al ser expuesto a la luz (visible o UV) y a la formación de ácido metacrílico como subproducto [10]. A continuación, en la Figura 2 se muestra un esquema para la síntesis de GelMA.

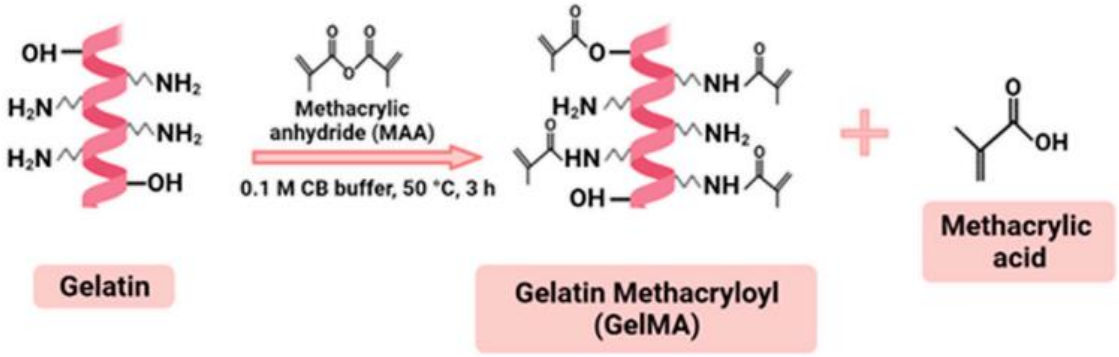


Figura 2. Esquema de reacción para la metacrilación de gelatina [11].

La presencia de anhidrido metacrílico sin reaccionar y ácido metacrílico durante la síntesis es un riesgo considerable de toxicidad que puede limitar su uso en aplicaciones biomédicas. La formación de ácido metacrílico es una reacción exotérmica que reduce el pH de la solución y puede afectar el rendimiento de la síntesis [8]. Luego de terminar la metacrilación es necesario purificar la solución mediante diálisis durante varios días [12].

2.2.1.1. Métodos de síntesis

La metacrilación de gelatina fue inicialmente desarrollada por Van del Bulcke en el año 2000 y su ruta de síntesis ha sido optimizada para mejorar el grado de sustitución de los grupos amino de la gelatina con anhidro metacrílico [13]. El método tradicional donde la reacción se lleva a cabo en una solución tampón PBS (pH=7,4) requieren ajustar el pH a lo largo de la reacción y agregar el anhidro metacrílico en intervalos de tiempo, obteniendo grados de sustitución variables, por lo que Shirahama *et al.* desarrolló el método de síntesis en un solo paso utilizando un buffer de carbonato-bicarbonato (CB) de alta molaridad para contrarrestar los cambios de pH que se dan durante la metacrilación, obteniendo grados de sustitución de hasta 96% sin la necesidad de ajustar el pH durante la reacción y utilizando cantidades más pequeñas de anhidro metacrílico [14].

2.2.1.2. Control de parámetros

Durante la reacción de metacrilación es fundamental controlar el pH. Para que se dé la sustitución de los grupos amino de las cadenas de lisina de la gelatina es necesario que el pH se mantenga por encima del punto isoeléctrico (pH entre 4-5 para tipo B) para conservar la neutralidad de los grupos amino, ya que, bajo condiciones de pH ácido, estos grupos funcionales se protonan, lo que evita la sustitución de la lisina por los grupos metacrilato; por otro lado, si el pH se encuentra por encima de 11, la reacción no se da debido a la hidrólisis del anhidro metacrílico [15], [16].

2.2.1.3. Grado de sustitución

El grado de sustitución de la lisina por los grupos funcionales metacrilato es un parámetro crucial en las propiedades finales de un hidrogel de gelatina funcionalizada debido a que la presencia de los grupos funcionales metacrilato define el grado de entrecruzamiento por fotopolimerización. La síntesis con tampón carbonato-bicarbonato aumenta el grado de sustitución hasta un 95% y se ha demostrado que un grado de sustitución alto se asocia con un módulo de Young más alto, tiempos de degradación más largos y menor grado de hinchamiento [17]. El grado de metacrilación se cuantifica mediante la sustitución de lisina a través de resonancia magnética nuclear H mediante la ecuación 1 [11].

$$GS\ (\%) = \left(1 - \frac{\text{área pico de lisina metileno para GelMA}}{\text{área pico de lisina metileno para gelatina}}\right) * 100 \quad (1)$$

2.2.2. Propiedades de la gelatina metacrilada en hidrogeles

La gelatina presenta propiedades idóneas respecto a la biocompatibilidad, grado de hinchamiento, entre otras propiedades que la hacen apta para producir hidrogeles destinados a liberación controlada de fármacos.

2.2.2.1. Propiedades mecánicas

El ajuste de propiedades mecánicas se puede lograr mediante el control de parámetros como el grado de metacrilación y es una propiedad clave para producir sistemas de administración de fármacos o andamios que sean estructuralmente estables. Conforme aumenta la concentración de

gelatina el módulo de Young puede variar en el orden de 10-100 kPa [18]. Es importante considerar que la cuantificación de las propiedades mecánicas varía en función de la aplicación deseada. En hidrogeles se suele expresar a través del módulo de compresión y se ha demostrado que para GelMA al 10% m/v se encuentra entre 172,89-215,47 kPa [10].

2.2.2.2. Propiedades viscoelásticas

La viscosidad de la resina líquida antes de polimerizar es un parámetro fundamental que define la imprimabilidad de las resinas. Durante el proceso de impresión 3D cada vez que se levanta la plataforma de construcción se forma una brecha entre la capa recién polimerizada y el tanque que contiene la resina, por lo que esta debe ser lo suficientemente fluida (viscosidad entre 0.1-1.5 Pa·s) para llenar esta brecha y obtener impresiones de calidad [19].

El módulo de almacenamiento (G´) es una medida de la rigidez del hidrogel al ser sometido a esfuerzos cortantes y se relaciona directamente con el módulo de Young (E) mediante la ecuación 2 [20]. Los valores de G´ se pueden encontrar entre 0,1-30 kPa [21].

$$E = 2G´(1 + v) \quad (2)$$

Donde v corresponde al número de Poisson.

2.2.2.3. Porosidad

Otra propiedad importante para aplicaciones biomédicas corresponde al tamaño de poro. La arquitectura de hidrogeles depende en gran parte de los métodos de síntesis y el tamaño de poro puede variar entre 10-500 µm [22]. Para estructuras de gelatina, conforme aumenta la concentración del monómero el tamaño de poro disminuye, de igual manera un alto grado de metacrilación se asocia con una reducción del tamaño de poro [23].

El tamaño de poro deseado puede variar en función de la aplicación y su control es relevante sobre todo en ingeniería de tejidos, donde se requiere un tamaño que facilite la infiltración celular y el intercambio de nutrientes. En el contexto de administración de fármacos un tamaño de poro entre 0,1-1 µm permite la liberación del fármaco por difusión [24].

2.2.2.4. Grado de hinchamiento

El grado de hinchamiento es una propiedad de los hidrogeles que se relaciona con la porosidad y permite la difusión de fármacos, En el caso de hidrogeles de gelatina funcionalizada cuando se aumenta su concentración en un rango de 5-20% m/v el grado de hinchamiento pasa de 1500% a 500% [18]. Para sistemas de administración de fármacos un grado de hinchamiento alto es necesario para obtener perfiles de liberación prolongados a través del tiempo, donde un grado mayor a 150% se considera aceptable [25].

2.2.2.5. Biocompatibilidad

La gelatina funcionalizada retiene la biocompatibilidad y degradabilidad enzimática de la gelatina ya que las secuencia arginina-glicina-acido aspártico (RGD) y la matriz metaloproteinasa (MMP) que promueven la adhesión, crecimiento y proliferación celular no se ven afectadas durante la sustitución con grupos metacrilato [17]. La funcionalización de la gelatina con anhidrido metacrílico requiere menos del 5% de los residuos de aminoácidos en proporción molar [12].

Para que un material sea aprobado para su uso en dispositivos médicos por la FDA se debe mostrar su eficacia mediante ensayos clínicos en humanos, los cuales representan un riesgo, por lo que, antes de llevar a cabo estudios en humanos es necesario establecer ensayos pre-clínicos en modelos animales que demuestren su biocompatibilidad [26]. Actualmente, este material se encuentra en etapa de investigación donde se han llevado a cabo ensayos *in vivo* en modelos animales con resultados prometedores.

2.3. Fotopolimerización

2.3.1. Fotopolimerización

La fotopolimerización es un proceso para obtener polímeros entrecruzados donde la iniciación de la reacción se mediante la exposición a la luz de monómeros fotosensibles en presencia de un fotoiniciador que da comienzo a la reacción mediante la generación de radicales libres [27]. Este mecanismo de reacción permite mejorar las propiedades mecánicas y estabilidad química de la gelatina mediante la formación de enlaces covalentes entre los grupos funcionales metacrilato unidos a las cadenas de gelatina. Entre los parámetros que intervienen en el proceso y tienen un

efecto en las propiedades finales del material se encuentran la concentración de GelMA, el grado de sustitución, la intensidad de la luz y el tipo de fotoiniciador [28]. En la Figura 3 se puede ver el esquema para la reacción de fotopolimerización.

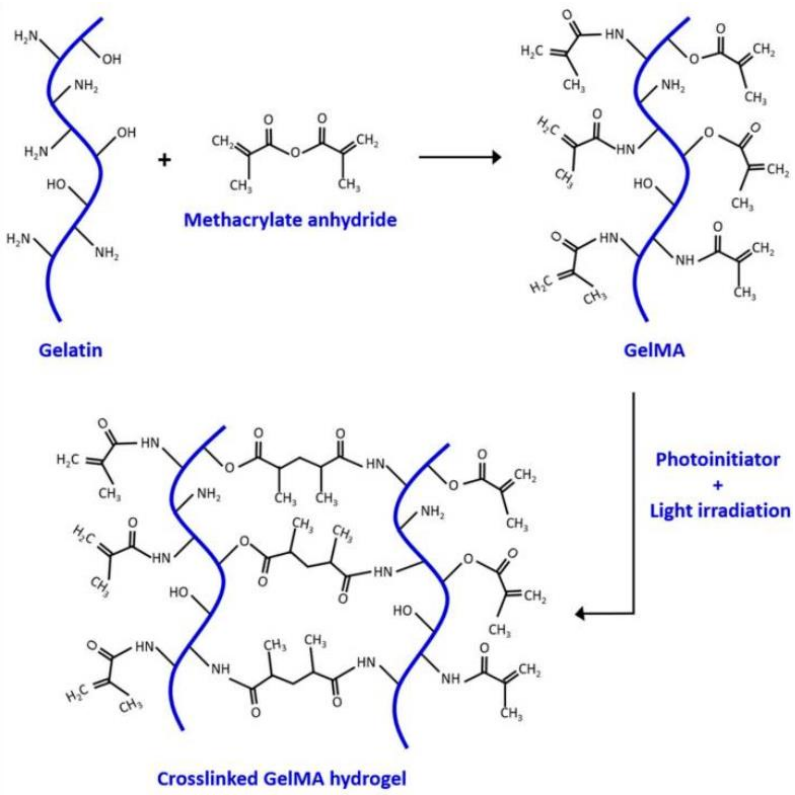


Figura 3. Esquema para el entrecruzamiento del hidrogel mediante fotopolimerización [28].

2.3.2. Fotoiniciadores

Un fotoiniciador es un compuesto con un grupo funcional cromóforo que al ser expuesto a luz visible o ultravioleta libera radicales libres que interactúan con el monómero, iniciando la reacción de fotopolimerización [29]. Existen fotoiniciadores de tipo I y II, cuya diferencia radica en que los del tipo II necesitan un co-iniciador para generar radicales libres.

2.3.2.1. Tipos de fotoiniciadores

Los fotoiniciadores del tipo I son aquellos que generan los radicales libres necesarios para que se dé la polimerización mediante la ruptura homolítica de sus enlaces al ser expuestos a la luz visible, sin la necesidad de usar reactivos adicionales [30]. Los del tipo II requieren un co-iniciador. En

el caso de los fotoiniciadores tipo II, la formación de radicales libres se da mediante la donación de átomos de hidrógeno por parte del co-iniciador, que suelen ser aminas terciarias presentes en la misma resina o en solventes [31]. En la Figura 4 se observa un esquema del mecanismo de reacción para ambos tipos.

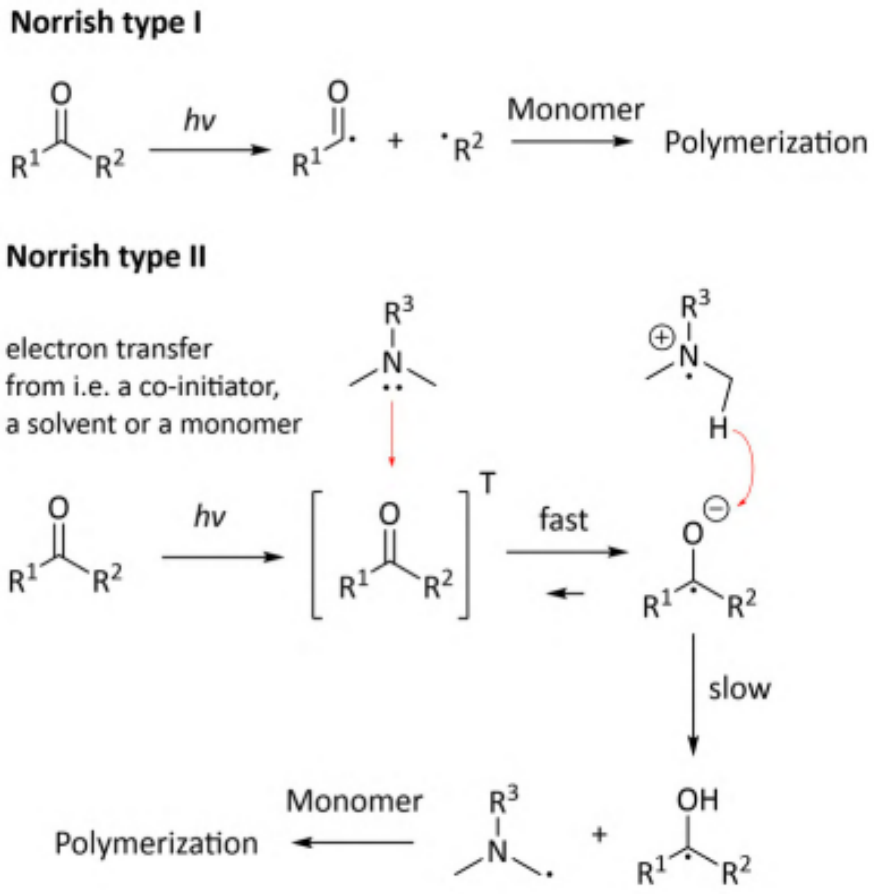


Figura 4. Esquemas de reacción para fotoiniciadores del tipo I y II [29].

2.3.2.2. Fotoiniciadores solubles en agua

Entre los fotoinciadores solubles en agua más comunes se encuentran el 2-hidroxi-4-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona (Irgacure 2959), óxido de difenil(2,4,6-trimetilbenzóil)fosfina (TPO), fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LAP), 2,2′-Azobis[2-metil-N-(2-hidroxietil)propionamida] (VA-086), eosina-Y y riboflavina. En la Tabla 1 se puede observar un resumen de los principales fotoiniciadores solubles en agua para aplicaciones biomédicas.

Tabla 1. Comparativa de diferentes fotoiniciadores solubles en agua [32].

Molécula	λmax (nm)	Tipo	Ventajas	Desventajas
Irgacure 2959	276, 365	Tipo I	Baja citotoxicidad	Baja solubilidad y requiere fuente UV
TPO	267, 298 y 380		Alta estabilidad térmica	Baja solubilidad en agua
LAP	380.5		Alta solubilidad, puede usar fuentes de luz visible	Baja eficiencia de iniciación
VA-086	365		Alta solubilidad en agua, baja toxicidad	Libera nitrógeno provocando formación de burbujas
Eosina-Y	528	Tipo II	Alta solubilidad, espectro amplio de absorción, puede usar fuentes de luz visible	Requiere co-iniciador
Riboflavina	**222, 266, 373 y 444**		**Alta solubilidad, espectro amplio de absorción, no tóxico, beneficioso para células**	**Puede liberar especies reactivas de oxígeno**

2.3.2.3. Toxicidad

Una de las principales limitaciones de algunos fotoiniciadores en aplicaciones biomédicas corresponde a la toxicidad de sus moléculas, debido a que presentan absorción en la región UV, cuya exposición a este tipo de luz puede llegar a tener efectos tóxicos, provocando la muerte celular, mutaciones y daño al ADN [33]. Por otro lado, el LAP, que absorbe en el rango de luz

visible tiene efectos citotóxicos y podría llegar a inducir fallo renal, debido a la presencia de sales de litio [34].

En un estudio de Wang *et al.* se evaluó la toxicidad de cuatro fotoiniciadores comúnmente empleados en impresión 3D de procesamiento de luz digital (DLP), entre ellos el TPO, 2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA), (Irgacure 2959) y riboflavina / trietanolamina (RF / TEOA), donde hallaron que los andamios producidos con RF / TEOA son capaces de promover la proliferación celular hasta 10 días y mostraron una respuesta inmune baja tras 14 días de ser implantados [31].

2.3.2.4. Riboflavina

La riboflavina (RF) es un compuesto natural que se utiliza como fotoiniciador tipo II y que al ser irradiado con luz UV o visible, se excita pasando a un estado triplete altamente reactivo, desde el cual puede generar radicales libres mediante transferencia de electrones o abstracción de hidrógeno. Está aprobada por la FDA como fotoiniciador y es soluble en agua, por lo que es una alternativa viable para el entrecruzamiento de hidrogeles a base de gelatina [35].

Cuando la RF absorbe energía pasa a un estado singlete excitado de corta vida (^{1}RF*), del cual una fracción pasa al estado triplete (^{3}RF*) y parte de las moléculas excitadas retorna al estado basal liberando energía como calor o fluorescencia, mientras que el triplete puede relajar o transferir energía a moléculas vecinas induciendo reacciones de entrecruzamiento [35]. Existen 2 mecanismos a través de los cuales se induce el entrecruzamiento de la gelatina mediante la formación de enlaces covalentes. Además, la riboflavina puede entrecruzar gelatina mediante la modificación fotodinámica de la tirosina, basada en la formación de ditirosina [36].

Esta molécula presenta picos máximos de absorción en el rango de luz visible (444 nm) y en el rango UV (373, 266 y 222 nm) [37]. La intensidad de la absorción de luz es mayor en los picos de la región UV y la región visible tiene un rango de longitud de onda más amplio, como se puede ver en la Figura 5. Cada uno de los picos que se observan en la Figura 5 corresponden a las longitudes de onda donde la riboflavina presenta mayor intensidad de absorción de luz que da lugar a la transferencia de electrones a través del sistema redox-activo de isoaloxazina [35]. Las

flavinas utilizan el sistema redox-activo de isoaloxazina que es capaz de llevar a cabo reacciones de transferencia de uno o dos electrones y le confiere a la riboflavina su color y propiedades fotoquímicas [38].

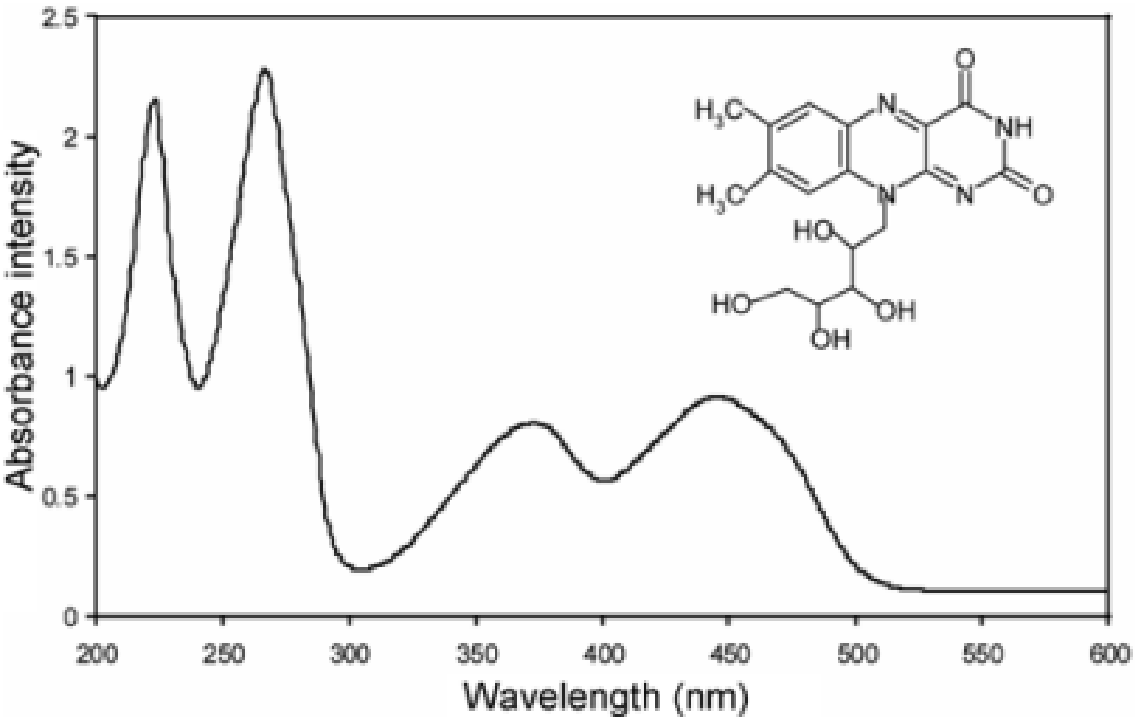


Figura 5. Estructura molecular y espectro de absorción de luz para riboflavina [39].

Debido a que RF es un fotoiniciador del tipo II requiere un donador de átomos de hidrógeno para mejorar la eficiencia en la formación de radicales libres es común utilizar sistemas de iniciación con TEOA. El uso de RF con TEOA como co-iniciador presenta mayor biocompatibilidad que fotoiniciadores como el Irgacure 2959, que puede llegar a tener efectos citotóxicos incluso en bajas concentraciones (<0,5% wt) [40]. A pesar de que los sistemas de RF / TEOA presentan mayor biocompatibilidad que otros fotoiniciadores, el uso de aminas sintéticas representa un desafío para **la producción de hidrogeles biobasados libres de sustancias tóxicas**, por lo que varios autores han planteado alternativas utilizando aminoácidos como la L-arginina.

En un trabajo de Kim *et al.* se desarrolló un hidrogel a base de dextrano-metacrilato entrecruzado por luz visible mediante RF / L-arginina como iniciador / co-iniciador obteniendo un entrecruzamiento más rápido con mejores propiedades mecánicas utilizando concentraciones

bajas de riboflavina (0,01-0,5% wt) y también se halló que el rango óptimo de L-arginina se encuentra entre 2-10% wt [39]. En otro estudio los mismos autores hallaron que la generación de radicales libres y la cinética de la reacción se ven influenciados por el pH, donde se obtienen mejores resultados en condiciones de pH neutro [41].

Dependiendo de la estructura química del monómero de partida para la resina no es necesario utilizar un co-iniciador, ya que los mismos grupos amino del monómero se encargan de la donación de átomos de hidrogeno necesarios para iniciar la fotopolimerización. Previamente se ha demostrado la eficacia de utilizar solo RF como agente de entrecruzamiento para fortalecer la estructura del colágeno de la córnea en el tratamiento del queratocono para evitar el progreso del padecimiento [42].

RF se ha utilizado también para impresión 3D de estructuras reticuladas a partir de colágeno mediante la formación de enlaces covalentes intra en intermoleculares entre los aminoácidos del colágeno, obteniendo impresiones de alta precisión y andamios con tiempos de degradación más largos debido al entrecruzamiento [43].

2.4. Impresión 3D

2.4.1. Estereolitografía (SLA)

Las tecnologías de manufactura aditiva permiten la fabricación de estructuras tridimensionales complejas con varios tipos de materiales, entre ellos se encuentran las resinas foto curables, siendo alternativas atractivas para aplicaciones biomédicas donde se requieren soluciones personalizadas debido a la capacidad de producir estructuras complejas, un bajo costo y tiempo de producción [19].

Una impresora de SLA funciona con una plataforma móvil que se sumerge en un tanque transparente lleno de resina y un láser se encarga de trazar la geometría de cada una de las capas de la pieza curando la resina; conforme van curando las capas la plataforma asciende en la dirección “Z” con alturas de capa entre 10-150 µm a una velocidad de impresión de 10-20 mm/h [44]. En la Figura 6 se pueden ver los componentes de una impresora 3D de resina.

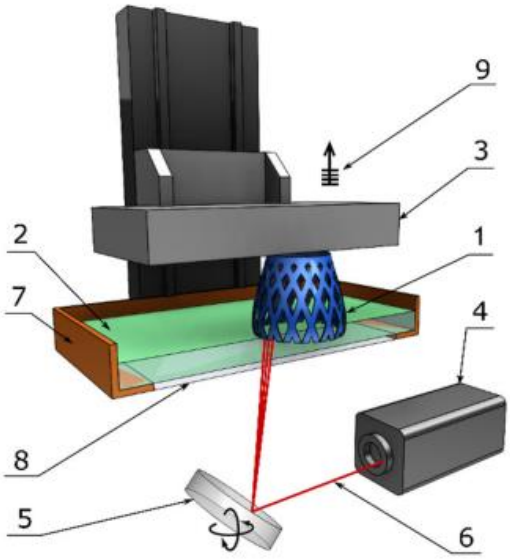


Figura 6. Componentes de una impresora SLA: 1-parte impresa, 2-resina líquida, 3-plataforma móvil, 4-fuente de luz, 5-espejo de escaneo XY, 6-láser, 7-tanque de resina, 8-ventana, elevación en dirección Z [44].

2.4.1.1. Ventajas

Con métodos tradicionales como fundición por solvente, donde se vierte la resina líquida fotocurable en un molde que se expone a luz ultravioleta, se obtienen resultados poco homogéneos debido a una irradiación y distribución desigual del monómero [45]. Con SLA se tiene mayor control sobre la homogeneidad en las propiedades finales de la parte impresa debido a que el curado se va realizando capa por capa.

Respecto a otras técnicas de impresión 3D basada en fotopolimerización SLA tiene una precisión más alta debido a que la fuente de luz es un láser y la precisión depende del tamaño mínimo de punto (140 µm), opuesto a las pantallas de impresoras de procesamiento de luz digital, cuya precisión está limitada al tamaño mínimo de píxel del proyector [44].

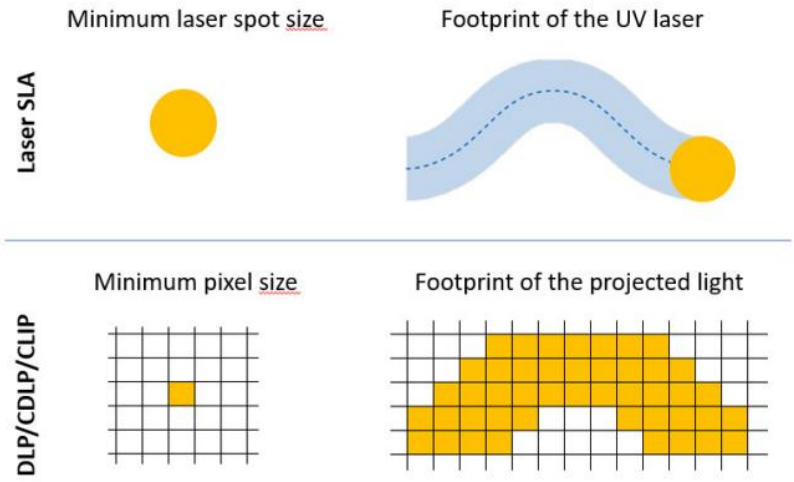


Figura 7. Comparación de la precisión entre SLA y otras tecnologías de impresión 3D [44].

2.5. Sistemas de administración de fármacos

Los hidrogeles constan de polímeros hidrofílicos que forman estructuras tridimensionales capaces de encapsular fármacos ofreciendo una liberación precisa del medicamente, un tiempo de acción prolongado con efectos secundarios muy reducidos, por lo que son ampliamente estudiados para diversos padecimientos, entre ellos el tratamiento de heridas crónicas [46]. Los biopolímeros como la gelatina son ideales para este tipo de aplicaciones debido a que son materiales biodegradables, presentan buena biocompatibilidad, retención de agua y propiedades viscoelásticas [47].

2.5.1. Liberación controlada de fármacos

2.5.1.1. Mecanismos de liberación

En el contexto de hidrogeles, existen 3 mecanismos que gobiernan la liberación del fármaco y tienen un efecto directo sobre el perfil de liberación, que corresponden al mecanismo controlado por difusión, hinchamiento y químicamente controlado.

El mecanismo controlado por difusión es el más común y ocurre en sistemas de matriz polimérica. En este mecanismo el fármaco se difunde a través de la matriz desde la región de mayor a menor concentración y la velocidad de difusión depende del coeficiente de difusión, del gradiente de concentración y la porosidad del hidrogel [48].

El grado de hinchamiento es una de las propiedades más importantes para alcanzar una liberación prolongada en el tiempo. La liberación controlada por hinchamiento se rige por el principio de ósmosis y ocurre cuando la tasa de difusión del principio activo es mayor que la tasa de hinchamiento [49].

Los mecanismos químicamente controlados se basan en la erosión controlada por una serie de reacciones hidrolíticas o enzimáticas, liberando el fármaco encapsulado en la matriz polimérica, cuya degradación se puede dar a nivel superficial o volumétrico [49].

El perfil de liberación de un fármaco se expresa como la cantidad de concentración del medicamento en plasma en función del tiempo. Existen dos niveles de concentración importantes, la concentración mínima eficaz (CME), donde por debajo de ese nivel el fármaco no hace efecto y la concentración tóxica (CT), que corresponde al nivel donde empiezan a haber efectos secundarios negativos, por lo que mantener la concentración dentro del rango de MEC y DA es crítico para asegurar un tratamiento efectivo [50]. En la Figura 8 se pueden ver distintos perfiles de liberación, entre ellos se encuentra los de liberación inmediata, de liberación sostenida, que ocurre cuando el fármaco se libera lentamente a través del tiempo y los de orden cero que liberan una cantidad constante por unidad de tiempo independientemente de la concentración del fármaco [50].

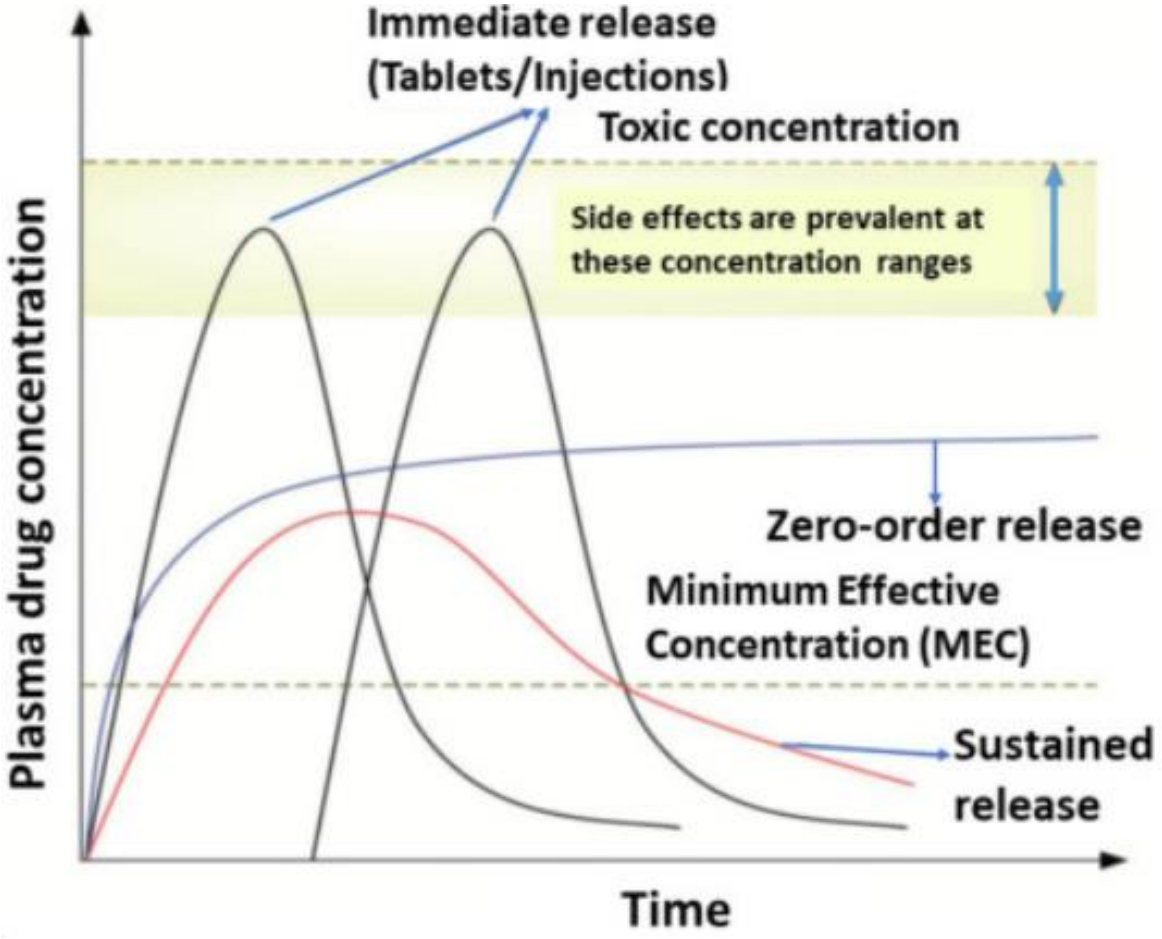


Figura 8. Perfiles de cinética de liberación de fármacos [50].

Existen varios modelos matemáticos que sirven para predecir el mecanismo de liberación que gobierna la administración del fármaco entre los cuales se encuentran los modelos de orden cero, de primer orden, Higuchi para mecanismos gobernados por difusión y Kosmeyer-Peppas para mecanismos gobernados por hinchamiento [51]. A continuación, se muestra la ecuación para la difusión de Fick.

$$N_A = -D\frac{dC_A}{dx} \tag{3}$$

Donde N_A corresponde al flujo del fármaco, D es el coeficiente de liberación del fármaco y C_A corresponde a la concentración del fármaco

El modelo de orden cero describe un sistema donde la tasa de liberación es independiente de la concentración del fármaco y el mecanismo que gobierna estos modelos corresponde al de difusión [52]. Este modelo es descrito mediante la ecuación 4.

$$Q_t = Q_0 + K_0 * t \quad (4)$$

Donde Q_t es la cantidad de fármaco liberada a un tiempo t, Q_0 corresponde a la cantidad total de fármaco en el medio y K_0 es la constante de liberación de orden cero en unidades de concentración/tiempo.

El modelo de primer orden describe los mecanismos de liberación donde existe dependencia de la concentración del fármaco en la tasa de liberación mediante la ecuación 5 [52].

$$\log(Q) = \log(Q_0) - K_1 t/2.303 \quad (5)$$

Donde Q_0 corresponde a la concentración inicial, K_1 es la constante de liberación de primer orden (expresado en unidades de tiempo^{-1}).

El modelo de Higuchi describe la liberación controlada por difusión a través de la matriz polimérica del hidrogel en función de la geometría. A continuación, se muestra la ecuación para el modelo de Higuchi [52].

$$Q_t = K_H \sqrt{t} \quad (6)$$

Donde Q_t es la cantidad de fármaco liberada a un tiempo t, K_H corresponde a la constante de liberación de Higuchi (concentración/tiempo).

El modelo de Kosmeyer-Peppas describe los mecanismos de liberación gobernados por hinchamiento, donde se da un cambio en las dimensiones del hidrogel con la liberación del fármaco [52].

$$Q_t/Q_\infty = K_{KP} t^n \quad (7)$$

Donde Qt/Q corresponde a la fracción de fármaco liberado en un tiempo t, K_{KP} corresponde a la tasa de liberación constante y n corresponde al exponente de liberación.

2.5.1.2. Incorporación de fármacos

Para que la impresión 3D sea útil en aplicaciones biomédicas es necesario aplicar métodos de incorporación de fármacos que aseguren una distribución uniforme del fármaco, manteniendo la integridad de los grupos funcionales del principio activo. El método más sencillo consiste en la incorporación directa mediante la disolución del fármaco en la resina líquida asegurando una distribución uniforme a lo largo del sistema de administración [53]. Luego de la impresión el fármaco queda encapsulado dentro de la red polimérica entrecruzada, siendo liberado por difusión conforme la matriz polimérica absorbe agua. En casos donde la exposición a luz (UV o visible) puede degradar el fármaco o se tiene una baja solubilidad en la resina líquida la incorporación se puede realizar luego de la impresión 3D mediante inmersión en una solución concentrada del fármaco o conjugación covalente con la desventaja de que se tiene menos control sobre la cantidad del fármaco que va cargado en el hidrogel [53]. En la Figura 9A se observa un diagrama esquemático para los métodos de incorporación.

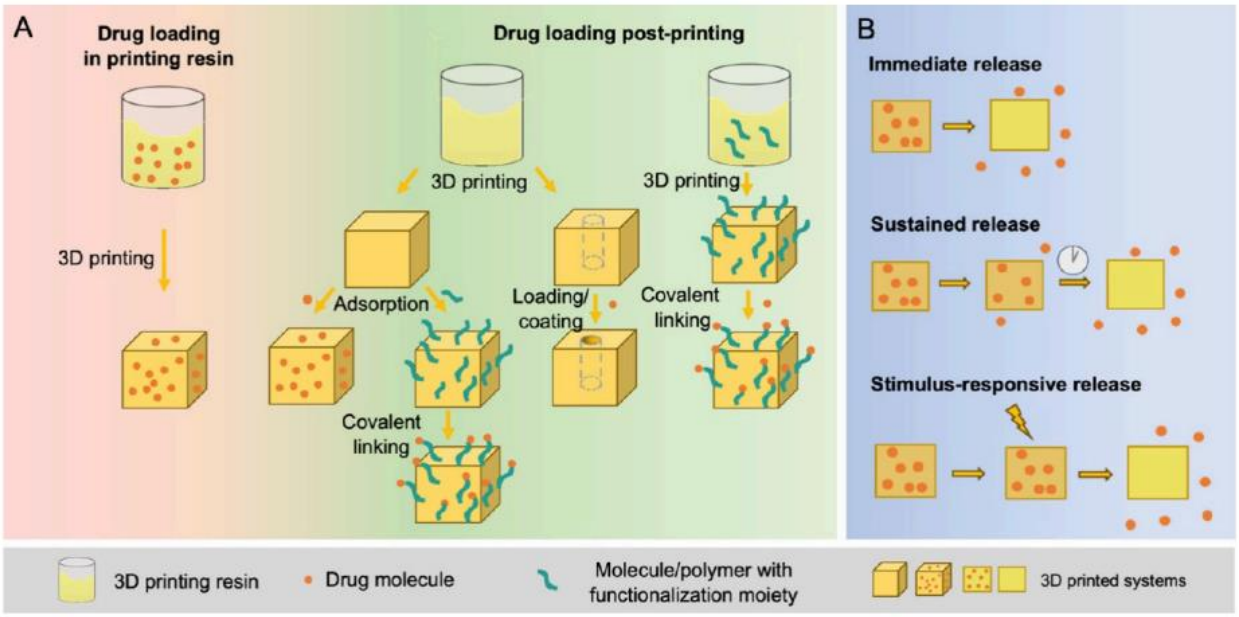


Figura 9. Esquema para la incorporación de fármacos. (A) Métodos de incorporación. (B) Métodos de liberación [53].

2.5.1.3. Tratamiento de heridas

La regeneración de heridas es un proceso complejo mediante el cual se restaura el tejido dañado de la piel, recuperando su funcionalidad y apariencia en cuestión de tiempo. Existen úlceras o heridas crónicas que no sanan mediante los procesos normales de la piel, estos reducen la calidad de vida de la persona [54]. Los sistemas de administración dermales y transdermales han tomado relevancia en los últimos años para el tratamiento de heridas crónicas mediante la entrega local de analgésicos o agentes que aceleran el proceso de cicatrización. Presentan ventajas como una duración prolongada de administración y la capacidad de ser autoadministrados [24].

2.5.1.4. Extracto de acerola

El extracto de acerola es una fuente de vitamina C. Tiene propiedades relevantes para el tratamiento de heridas y la reparación de tejido subcutáneo ya que la vitamina C juega un papel clave en la síntesis de colágeno, proliferación de fibroblastos y angiogénesis [55]. A diferencia de la vitamina B2, la vitamina C presenta picos de absorción de luz a 265 nm, lo que hace posible cargar este fármaco en hidrogeles o resinas fotocurables mediante la exposición a luz UV o violeta.

2.5.1.5. Estudios relevantes

Existen numerosos estudios que respaldan el potencial de la gelatina funcionalizada para producir sistemas de administración de fármacos destinados al tratamiento de distintos padecimientos. En un estudio de Baykara *et al.* se diseñaron arreglos de microagujas con alturas de 1000, 750 y 500 μm bajo diferentes parámetros de impresión. Utilizaron una solución de gelatina funcionalizada al 10% m/v con LAP como fotoiniciador al 0,5% m/v y se obtuvo una mejor calidad de impresión con tiempos de exposición por capa de 70 s con una mejor resistencia mecánica con una altura de aguja de 500 μm [11]. En otro estudio de los mismos autores desarrollaron microagujas de dimensiones similares cargadas de amoxicilina, donde se demostró que el sistema de administración propuesto inhibe considerablemente el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante pruebas *in-vitro* [56].

En 2025 Dehli *et al*. desarrollaron hidrogeles de gelatina funcionalizada al 30% m/v con un sistema de fotoiniciación biobasado a partir de RF (190 mmol/L) y clorhidrato de arginina mediante la técnica de fundición por solvente. Hallaron una correlación directa entre el aumento

en la concentración del co-iniciador, una mejora en las propiedades mecánicas (Módulo de almacenamiento entre 2,5-17 kPa) y una reducción en el tiempo de curado. Mediante ensayos de citotoxicidad con queratocitos corneales humanos demostraron que hay mayor viabilidad celular con tiempos reducidos de irradiación debido a que se producen menos radicales [20].

Goto *et al.* sintetizaron andamios curados con RF con luz visible y también utilizaron Irgacure 2959 a modo de comparación para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Respecto a las propiedades mecánicas se obtuvo un módulo de compresión de 16 kPa utilizando RF como fotoiniciador. Los andamios producidos con RF mostraron mayor viabilidad y diferenciación celular de osteoblastos [57].

3. Metodología

3.1. Metacrilación de gelatina

La metacrilación se llevó a cabo siguiendo un procedimiento previamente establecido [14]. Inicialmente se preparó una solución tampón carbonato-bicarbonato 0,25 M con un pH de 9,62 agregando 0,398 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y 0,735 g de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) en 50 mL de agua. Seguidamente se disolvieron 5 g de gelatina tipo B en la solución a 50°C con agitación magnética constante (600 rpm) y se agregaron 0,1 ml de anhidrido metacrilico por cada gramo de gelatina dejando reaccionar durante 3h. Una vez transcurrido el tiempo se ajustó el pH a 7,4 y se dializó la solución con 2 tubos flexible de membrana de diálisis de acetato de celulosa (corte de peso molecular de 12–14 kDa) en un volumen de 500 ml a 40°C durante 3 días para eliminar los residuos de ácido metacrílico y anhidrido metacrilico. Finalmente se liofilizó la solución de gelatina funcionalizada durante 2 días.

3.2. Preparación de la tinta

Se disolvió 1g de gelatina funcionalizada en 10 mL de PBS 1X (pH=7,14) a 40°C bajo agitación magnética (300 rpm) durante 30 minutos. Luego se agregó riboflavina al 0,2 % y L-arginina al 10% m/m respecto a la cantidad de gelatina funcionalizada según lo reportado por Wang et al. [36]. Por último, se llevó la solución a temperatura ambiente y se agregó extracto de acerola a una concentración de 1 mg/ml.

3.3. Pruebas de curado

Se evaluó la concentración óptima de riboflavina y L-arginina para utilizar la formulación con un menor tiempo de curado en impresión 3D. Se prepararon formulaciones de gelatina funcionalizada al 10% m/v en 1 mL de PBS 1X (pH=7.14), utilizando concentraciones de riboflavina de 0,2, 0,5 y 1% m/m respecto a la cantidad de gelatina funcionalizada. Luego se evaluó la concentración de L-arginina a 10, 20 y 30% m/m respecto a la cantidad de gelatina funcionalizada.

3.4. Impresión de estructuras 3D

3.4.1. Diseño de estructuras en CAD

Mediante la herramienta de diseño *SolidWorks* se diseñaron discos de 6 mm de diámetro x 1 mm de altura. Se convirtió el archivo a formato *STL* y se laminó con el software de la impresora 3D.

3.4.2. Impresión 3D

Para imprimir el prototipo se utilizó una impresora *Anycubic Photon Mono X* donde se transfirió el archivo STL al equipo y se vertieron 10 mL de la tinta preparada previamente. Se indujo el entrecruzamiento utilizando una longitud de onda de 405 nm, con una duración de 200 s por capa. Se realizaron pruebas utilizando espesores de capa de 100, 50 y 10 μm. En la Tabla 2 se muestran las especificaciones técnicas de la impresora.

Tabla 2. Especificaciones técnicas para la impresora Anycubic Photon Mono X.

Parámetro	Valor
Tecnología de impresión	SLA
Volumen máximo de impresión	(192 x 120 x 245) mm
Resolución eje XY	0,050 mm
Espesor mínimo de capa	0,01 mm
Fuente de luz	Filamento (405 nm)
Compatibilidad con otras resinas	Resinas UV de 405 nm

3.5. Caracterización fisicoquímica

3.5.1. FTIR

Para analizar la estructura química se utilizó un *Nicolet IS50 FT-IR*. Se midieron los espectros para la gelatina, la gelatina metacrilada para verificar los principales grupos funcionales de la gelatina y el hidrogel para confirmar el entrecruzamiento colocando una muestra directamente sobre el detector que previamente se limpió utilizando toallas *kimwipes* con isopropanol al 70%. Se midió el espectro del extracto de acerola comercial y el hidrogel cargado con una concentración de 1 mg/ml de extracto de acerola para evaluar la capacidad de cargar el hidrogel sin que el fármaco interaccione con la matriz. Las mediciones se tomaron en un rango de 400-4000 cm^{-1}.

3.5.1. Resonancia magnética nuclear (H-NMR)

Se realizaron mediciones de H-NMR para determinar la sustitución de los grupos de metileno de lisina con un espectrómetro *Magritek Spinsolve 60 MHz*. Se midió el espectro para la gelatina y la gelatina funcionalizada disolviendo 10 mg en agua deuterada. Para la medición se utilizó una fuente 1D Extended+ a 128 escaneos con un tiempo de adquisición de 1,6 s y un ángulo de pulso de 90°.

3.5.2. Propiedades reológicas

La viscosidad de la solución de gelatina funcionalizada al 10% m/v con RF al 0.2% m/m y L-arginina al 10% m/m se midió utilizando un reómetro *Discovery Hybrid Rheometer (DHR-3) de TA Instruments* equipado con placas paralelas de 25 mm. Se colocó una gota y se midió la viscosidad dinámica entre 0,1-100 s^{-1} a temperatura ambiente. Se sumergieron las muestras en una solución PBS 1X hasta alcanzar el equilibrio de hinchamiento durante 48 h. Seguidamente se midió el módulo de almacenamiento entre 1-1000 a temperatura ambiente.

3.5.3. Grado de hinchamiento

Para evaluar la capacidad de retención del hidrogel se evaluó el grado de hinchamiento sumergiendo una muestra en PBS (pH=7,4) a 37°C donde se midió la masa luego de 10 min, 20 min, 40 min, 60 min, 2 h, 24 h (previo a cada medición se limpió el exceso de agua con ayuda de toallas *kimwipes*). El grado de hinchamiento se calculó mediante la ecuación 8 y se realizaron mediciones por triplicado [58].

$$Grado\ de\ hinchamiento\ (\%) = \frac{W_1 - W_0}{W_0} * 100 \quad (8)$$

Donde: W_1 corresponde al peso final y W_0 al peso inicial.

3.5.4. Microscopía electrónica de barrido

Para evaluar la morfología superficial del hidrogel se utilizó un microscopio electrónico de barrido *SEM Jeol JSM-6390LV*. Previo a la medición se liofilizó la muestra (-90°C , 0,05 mbar) y se realizó un recubrimiento con oro de 5-10 nm mediante sputtering con un voltaje de 20 kV.

3.5.5. Liberación controlada *in vitro*

Para evaluar la liberación controlada del extracto de acerola se sumergió una muestra cargada con una concentración de 1 mg/mL en 10 ml de solución PBS 1X (pH=7,4) a 37°C. Se tomaron alícuotas y se midió la absorción a 265 nm del volumen extraída y del blanco con un espectrofotómetro *Thermo Scientific Genesys 180* en intervalos de tiempo (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h y 6 h). Se utilizó una curva de calibración para estimar la concentración en el medio y se calculó la dosificación mediante la ecuación 9 [59]. Por último, se realizó el ajuste lineal de los resultados mediante los modelos de orden cero, de primer orden, de Higuchi y de Korsmeyer-Peppas para evaluar la cinética del sistema.

$$\%\ liberado = \frac{Q_t}{Q_\infty} * 100 \tag{9}$$

Donde Q_t corresponde a la fracción de fármaco liberada a un tiempo determinado y Q_∞ corresponde a la cantidad total del fármaco.

4. Resultados

4.1. FTIR

El análisis de FTIR permite confirmar la existencia de algunos enlaces químicos presentes en la gelatina mediante la presencia de señales correspondientes a la amida I, II y III. En la Figura 10 se observa el espectro de FTIR para la gelatina y la gelatina funcionalizada. Mediante esta técnica se puede ver la presencia de las amidas I, II y III [11]. Se tiene el pico de la amida I en la longitud de onda de 1637 cm^{-1}, que corresponde a las vibraciones del estiramiento de C=O de los grupos amida en proteínas [12]. El pico correspondiente a la amida II se observó a 1550 debido a la deformación en plano de los enlaces NH y al estiramiento de C=C [12]. Los picos presentes en 1240 corresponden al estiramiento de los enlaces C-N y a la deformación de los enlaces N-H de la amida III [12].

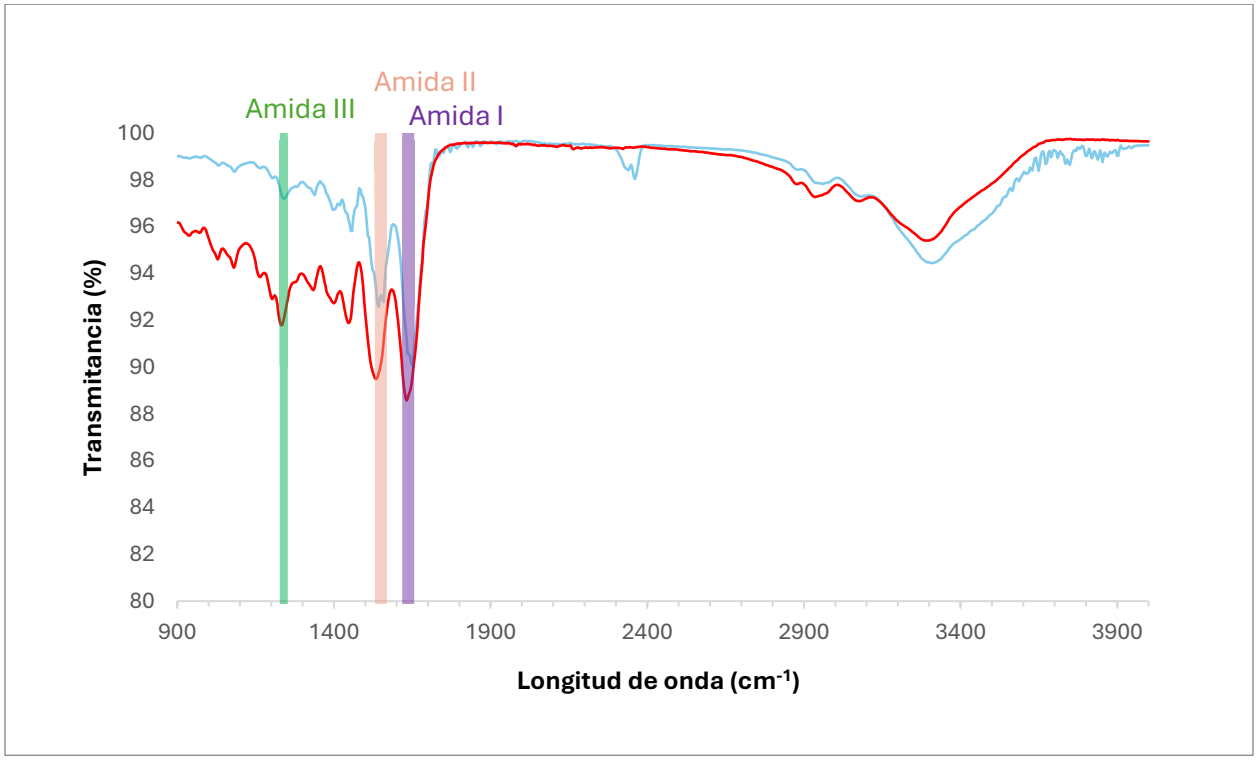


Figura 10. Espectro FTIR para gelatina (curva celeste) y gelatina funcionalizada (curva roja).

Se llevaron a cabo espectroscopías del hidrogel vacío, del extracto de acerola y del hidrogel cargado con acerola a 1 mg/ml como se ilustra en la Figura 11 para evaluar si se mantiene la estabilidad química del fármaco luego del curado.

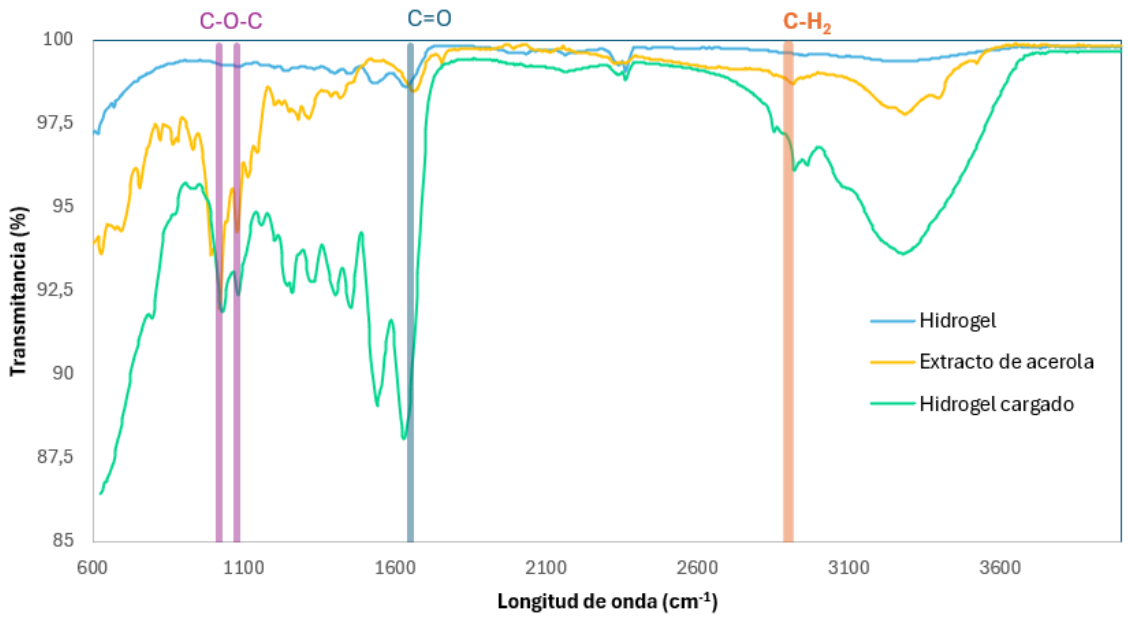


Figura 11. Espectro FTIR para el hidrogel de gelatina funcionalizada (curva celeste), extracto de acerola (curva amarilla) y para el hidrogel cargado con extracto de acerola a una concentración de 1 mg/ml.

Para el hidrogel vacío no se observan los picos característicos de la gelatina, lo que indica que luego de la etapa de impresión 3D y post curado se dio el entrecruzamiento por completo. Respecto al extracto de acerola, se observa una banda ancha en la región de 3400 correspondientes al estiramiento de enlaces O-H, propios de alcoholes y fenoles, mientras que a 2900 se observa un pico correspondiente al estiramiento simétrico y asimétrico de compuestos con enlaces C-H_2 [60]. Para el extracto de acerola la señal que se observa a 1650 corresponde al estiramiento de enlaces C=O. Luego se observan 2 picos a 1018 y 1076 cm^{-1} correspondientes al estiramiento de los enlaces cíclicos de C-O-C lactona, que se encuentran presentes en la vitamina C [61]. Para el caso del hidrogel cargado se conservan las señales características del extracto de acerola sin cambios significativos en la posición de los picos, lo que indica que no hubo interacción del

fármaco con la matriz durante el entrecruzamiento, manteniendo su estabilidad química, sin embargo, se conservan las señales correspondientes a las amidas I y II de la gelatina, lo que podría indicar la presencia de grupos funcionales residuales de gelatina.

4.2. H-NMR

Se llevó a cabo las mediciones de H-NMR para verificar la sustitución de la gelatina con los grupos metacrilato. Para el espectro de la gelatina (ver Figura 12) se encuentra una señal de interés a 2,9 ppm asociada a la lisina (línea verde) que corresponde al sitio de reacción, luego en el espectro de la gelatina funcionalizada (ver Figura 13) este pico reduce considerablemente su intensidad, lo que indica que la lisina fue sustituida efectivamente. El grado de sustitución se calcula mediante el cambio en el área de la curva de esta señal, sin embargo, debido a que se utilizó un espectrómetro de campo bajo (60 MHz) no se cuenta con suficiente sensibilidad para realizar el cálculo del área.

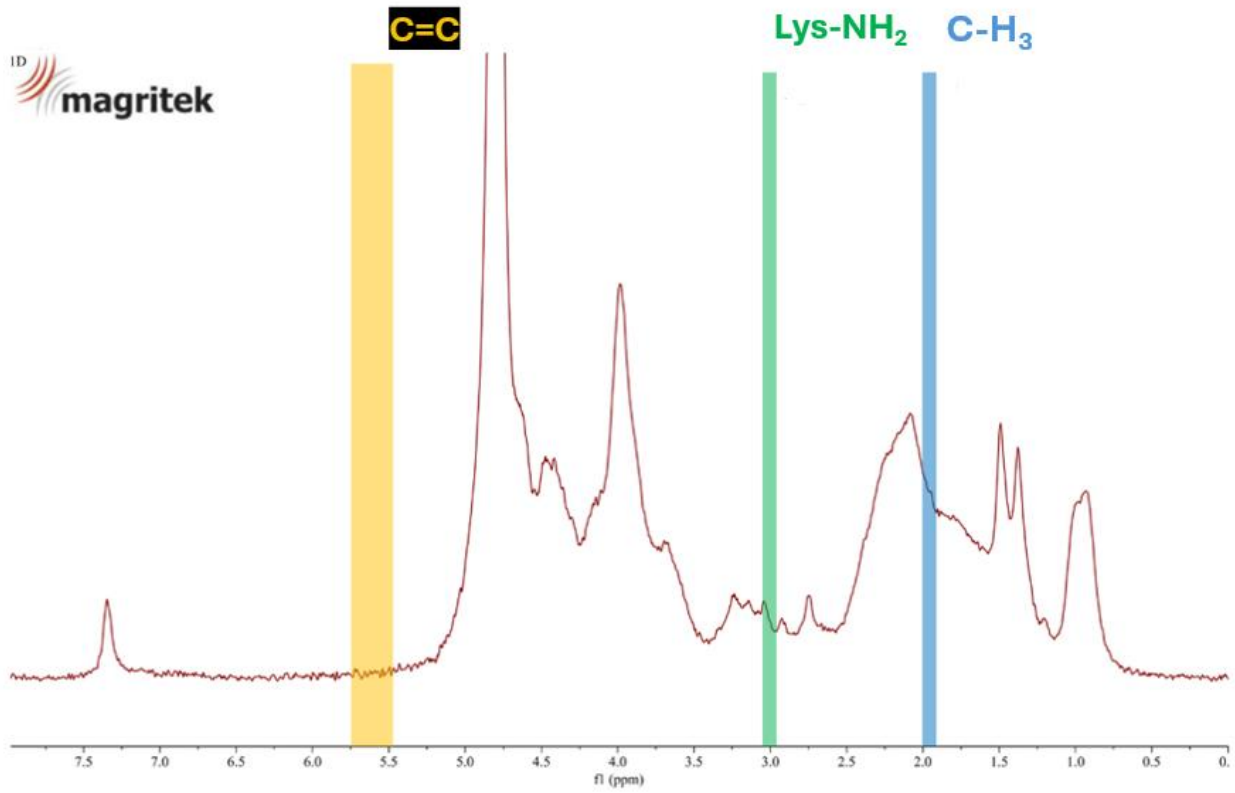


Figura 12. Espectro H-NMR para gelatina.

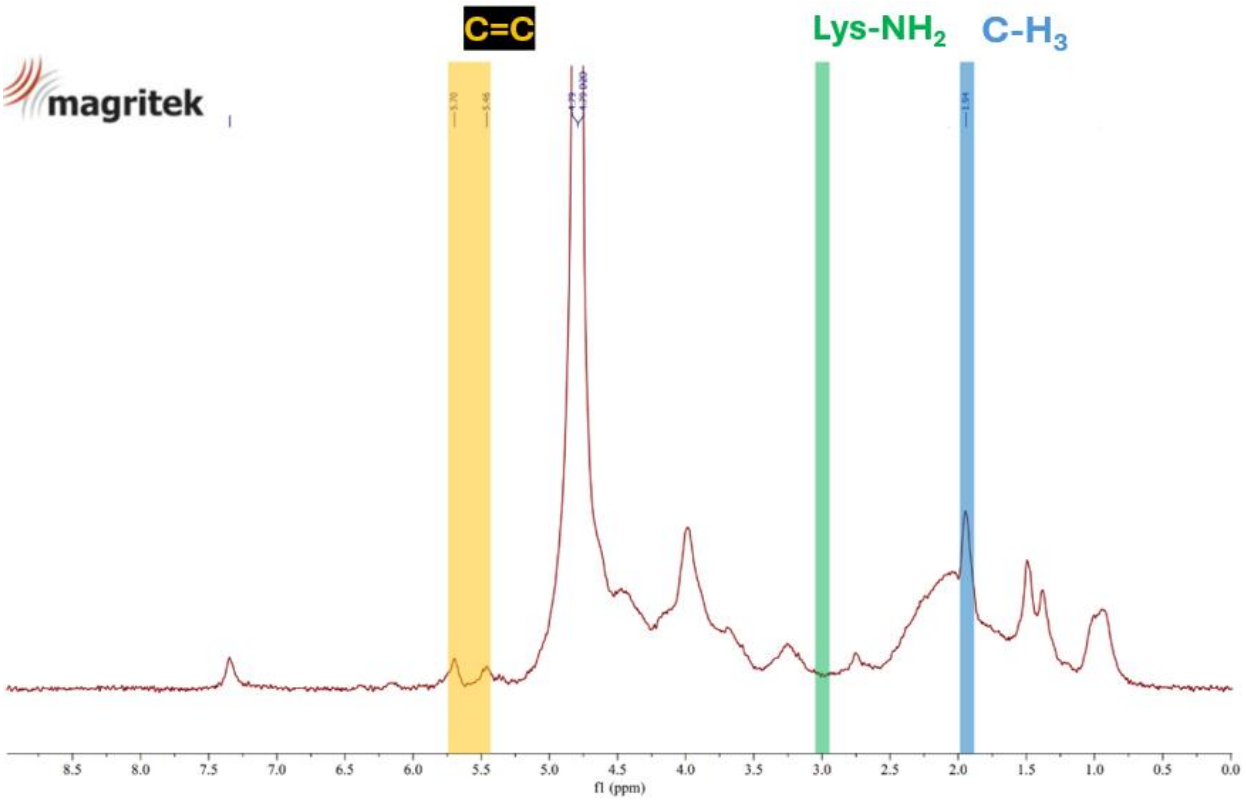


Figura 13. Espectro H-NMR para gelatina funcionalizada.

Para el caso de la gelatina funcionalizada se observan 2 señales a 5,4 y 5,6 ppm correspondientes a dos protones pertenecientes al doble enlace de los grupos metacrilato unidos a la lisina e hidroxilisina línea amarilla [12]. La nueva señal presente a 1,8 ppm corresponde al metilo del metacrilato unido a las cadenas de gelatina (línea azul). Tomando en cuenta lo anterior, se puede afirmar que durante la reacción de metacrilación se dio la sustitución de los grupos funcionales de lisina por metacrilato.

4.3. Curado e impresión 3D

4.3.1. Efecto de la concentración de riboflavina en el tiempo de curado

Se evaluó el efecto de la concentración de riboflavina en el tiempo de curado a una concentración de GelMA y L-arginina constante mediante irradiación a una longitud de onda de 405 nm en una cámara de curado. Para las 3 formulaciones se reportó el inicio de gelificación a los 5 minutos mediante la formación de una capa delgada en la base de la placa *Petri* y un tiempo final de curado

de 30 minutos con una concentración de riboflavina al 0,2% m/m respecto a la cantidad de monómero, cuando solidificó en su totalidad. Para la concentración de 0,5% el tiempo final fue de 50 minutos, mientras que para el 1% luego de 120 minutos todavía se conserva el color amarillo de la riboflavina y una consistencia líquida, por lo que el curado se consideró incompleto.

Tabla 3. Efecto de la concentración de riboflavina en el tiempo de curado para hidrogeles de gelatina funcionalizada (gelatina funcionalizada al 10% m/v en PBS y L-arginina al 10% m/m).

Riboflavina (% m/m)	Inicio gelificación (min)	Tiempo final de curado (min)
0,2	5	30
0,5	5	50
1	5	Incompleto

El curado se confirma también mediante el cambio en la coloración, debido a que la riboflavina tiene un color amarillo y al momento de reaccionar, cuando se da el entrecruzamiento del hidrogel, pasa a ser ligeramente transparente [57]. Conforme avanzó la reacción se observó que usando riboflavina al 0,2% m/m se dio el cambio de color cuando solidificó el hidrogel luego de 30 minutos, lo que indica que el fotoiniciador reaccionó. El curado del hidrogel fue confirmado mediante los resultados de FTIR que se muestran en la Figura 11.

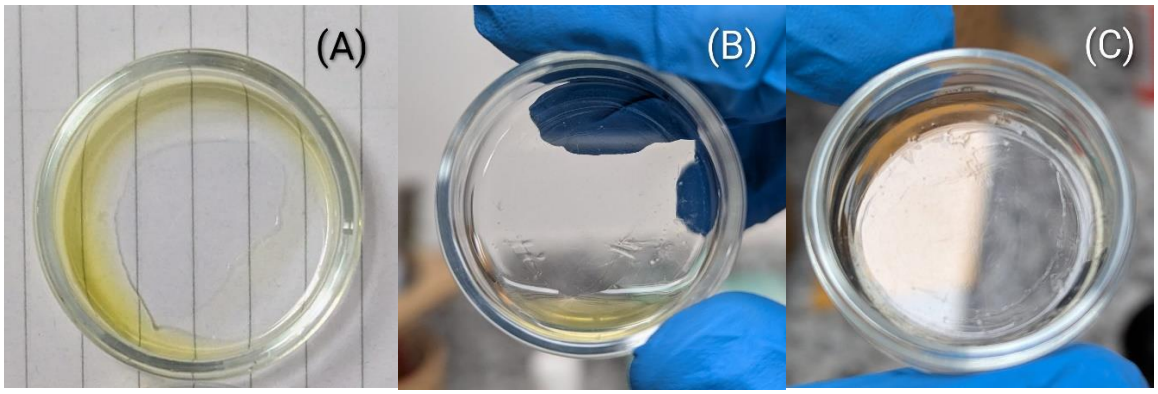


Figura 14. Hidrogel con riboflavina 0,2% m/m antes y después de curar bajo exposición a una longitud de onda de 405 nm. (A) Al inicio. (B) Luego de 5 minutos. (C) Luego de 30 minutos.

Con las formulaciones con riboflavina al 0,2% y 0,5% m/m se obtuvo un hidrogel entrecruzado con una buena flexibilidad, sin embargo, se seleccionó la concentración del 0,2% m/m debido a

que presentó el menor tiempo de curado a pesar de que 30 minutos es un tiempo elevado para impresión 3D, por lo que se evaluó también el efecto que tiene L-arginina con el fin de optimizar el tiempo.

4.3.2. Efecto de la concentración de L-arginina en el tiempo de curado

Con el fin de optimizar el tiempo de curado se evaluó el efecto de la concentración de L-arginina con una concentración constante de gelatina funcionalizada y de riboflavina. L-arginina promovió el entrecruzamiento en los tres casos evaluados, obteniendo hidrogeles manipulables que retienen su forma a la hora de sacarlos del molde, con una mayor integridad estructural con L-arginina al 10% m/m respecto a la cantidad de gelatina funcionalizada. Se determinó una concentración óptima de L-arginina al 10% considerando que se obtuvo un menor tiempo de curado y mejor manipulabilidad. La concentración óptima concuerda con lo reportado por Sin Hee Kim, donde hallaron que conforme aumenta la concentración de L-arginina se prolonga el tiempo de gelificación y se reduce la resistencia de los hidrogeles, al volverse más frágiles, rompiéndose durante su manipulación [39].

Tabla 4. Efecto de la concentración de L-arginina en el tiempo de curado para hidrogeles de gelatina funcionalizada (gelatina funcionalizada al 10% m/v en PBS y riboflavina al 0,2% m/m).

L-arginina (% m/m)	Inicio gelificación (min)	Tiempo final de curado (min)
10	5	30
20	5	60
30	5	100

El tiempo de curado fue de 30 min. Las pruebas de impresión 3D se llevaron a cabo con la formulación de riboflavina al 0,2% y L-arginina al 10% m/m.

4.3.3. Prueba de impresión 3D

Se realizaron pruebas de impresión para discos de 6 mm de diámetro x 1 mm de altura utilizando espesores de capa de 100, 50 y 10 μm, donde solamente se obtuvo partes impresas utilizando un espesor de capa de 50 μm. En la Figura 16 se ilustran los hidrogeles de gelatina funcionalizada cargados con extracto de acerola en la plataforma móvil al momento de terminar la impresión,

con un tiempo de exposición por capa de 200 s (límite establecido por la impresora) y un total de 18 capas la impresión duró aproximadamente 1 h para un arreglo de 7 discos. Saliendo de la impresora los hidrogeles presentaron una consistencia similar a un gel, lo que dificulta la extracción de la plataforma móvil y un color amarillo, que indica que la riboflavina no terminó de reaccionar por lo que fue necesario realizar una etapa de post curado durante 30 min para que se termine de dar el entrecruzamiento.



Figura 16. Hidrogeles de gelatina funcionalizada (10% m/v), riboflavina (0,2% m/m) y L-arginina (10% m/m) cargados con extracto de acerola (1 mg/ml)

En la Figura 17 se muestra un hidrogel recién impreso, 24 h después del post curado y en equilibrio (inmersión en agua durante 48 h). El hidrogel se contrae cuando pierde humedad y al

absorber fluidos nuevamente recupera su geometría. Las dimensiones que se muestran en la Tabla 5 indican que la tecnología de impresión 3D es capaz de producir piezas con precisión respecto a las dimensiones y geometría del modelo digital.

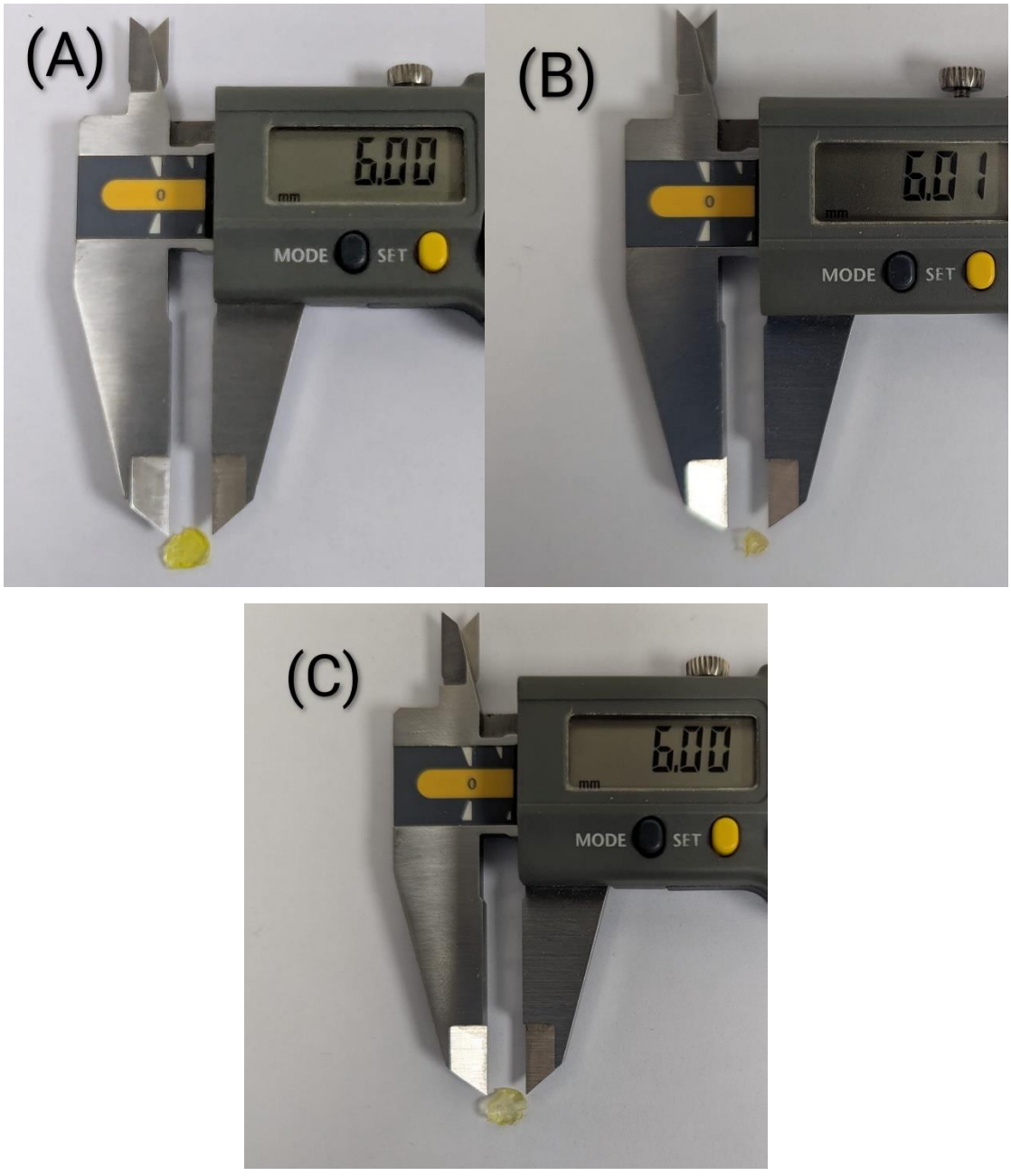


Figura 17. Hidrogel fabricado mediante impresión 3D. (A) Recién impreso. (B) 24 h después del post curado. (C) En equilibrio de hinchamiento.

Tabla 5. Dimensiones promedio para los hidrogeles fabricados mediante impresión 3D.

Geometría	Diámetro (mm)	Espesor (mm)
Modelo digital	6,00	1,00
Modelo impreso	6,003 ± 0,005	1,01 ± 0,03

4.4. Propiedades reológicas

Se llevó a cabo la caracterización reológica para obtener la viscosidad de la resina líquida. En la Figura 18 se muestra la viscosidad en función de la tasa de cizallamiento, donde se obtuvo un valor máximo de 0,00288 Pa·s, lo cual es ideal para impresión 3D ya que permite que la resina fluya bien y cubra el área de la plataforma sobre la cual se expone el láser.

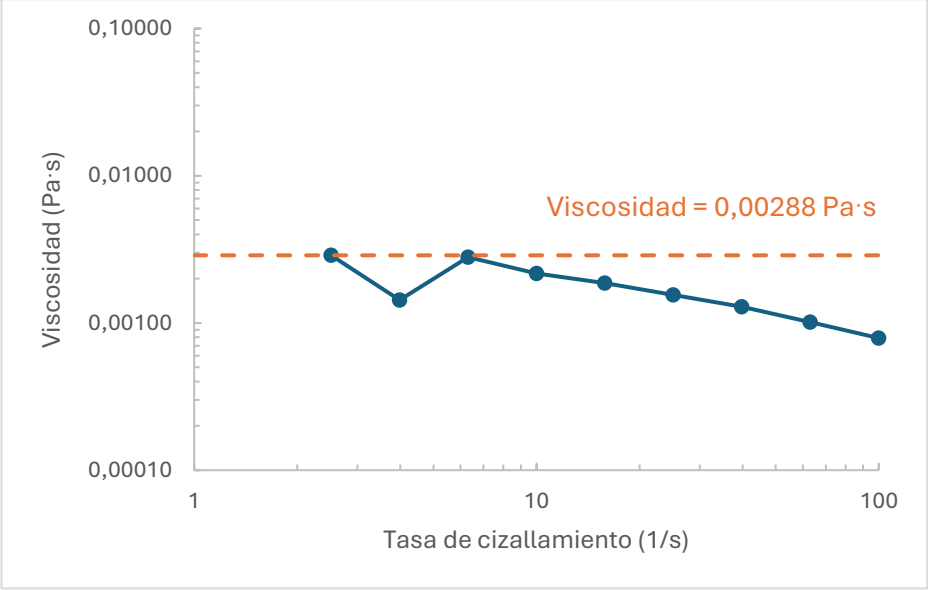


Figura 18. Viscosidad rotacional de cizallamiento para la tinta

El módulo de almacenamiento para los hidrogeles fue determinado luego del post curado como se ilustra en la Figura 19. Se identificó la región lineal viscoelástica del hidrogel en un rango de cizallamiento de 1% hasta 102%, lo que muestra la tenacidad del hidrogel al ser capaz de mantener

el comportamiento viscoelástica en un rango de esfuerzo cortante amplio [8]. El valor de G´ indica un comportamiento sólido o elástico, mientras que el módulo de pérdida G´´ se asocia a fluidos; cuando G´>G´´ el material analizado se comporta como un sólido [11]. Para el hidrogel obtenido predomina el comportamiento elástico con un valor de módulo de almacenamiento de 0.147 kPa en la región linear viscoelástica. El valor obtenido para G´ se encuentra dentro del rango reportado en la literatura para hidrogeles de gelatina metacrilada [21]. El hidrogel es apto para ser utilizado en administración de fármacos, ya que su resistencia permite que se manipule fácilmente sin comprometer su geometría y estructura.

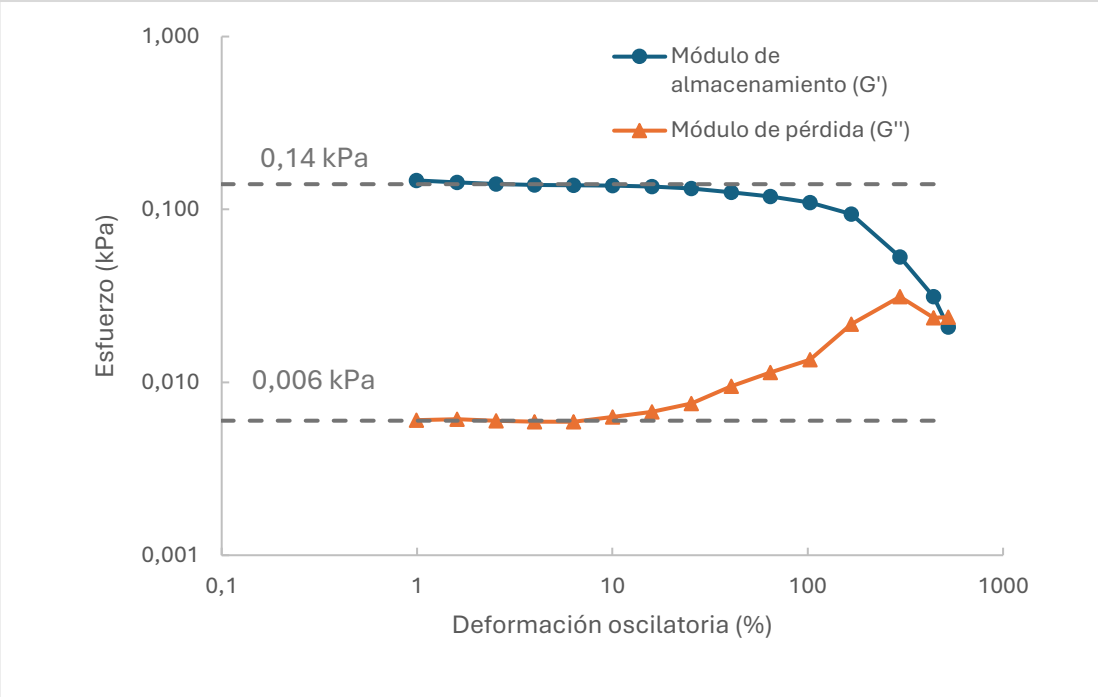


Figura 19. Análisis reológico de barrido de amplitud a una frecuencia angular de 1 rad/s para el hidrogel de gelatina funcionalizada

4.5. Grado de hinchamiento

En la Figura 20 se tiene el perfil para el grado de hinchamiento del hidrogel a lo largo de un periodo de 24 h, donde se observa un aumento abrupto a los 10 min, alcanzando un grado de hinchamiento promedio de 292%, momento a partir del cual se empieza a alcanzar el equilibrio. El equilibrio de hinchamiento corresponde al punto donde un hidrogel alcanza la cantidad máxima

de líquido que es capaz de absorber, de modo que el volumen se mantiene estable con el tiempo [62]. El hidrogel alcanzó el equilibrio aproximadamente a las 2 h de iniciar el ensayo con un grado de hinchamiento promedio de 359%, demostrando que tiene la capacidad de absorber fluidos que daría lugar a la difusión del fármaco en el medio.

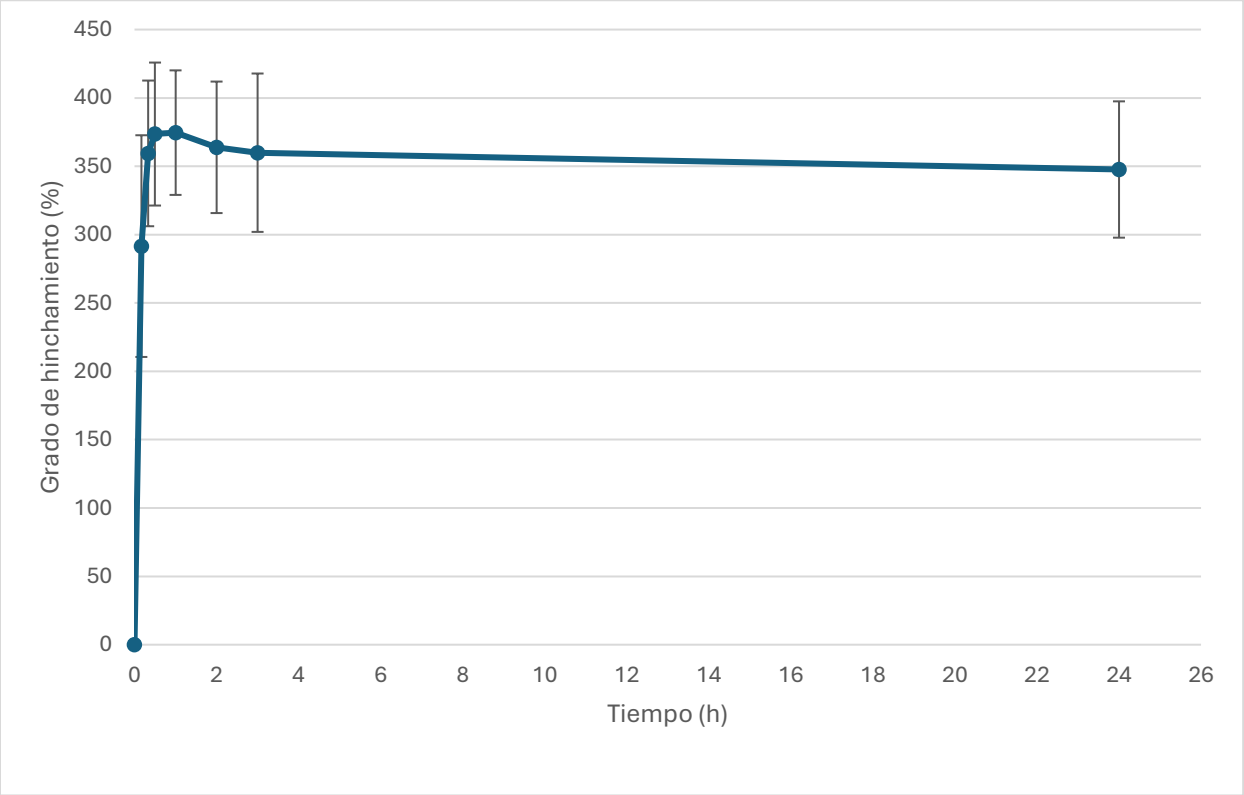


Figura 20. Grado de hinchamiento para hidrogel de gelatina funcionalizada

4.6. Liberación controlada

El perfil de liberación para el hidrogel cargado con extracto de acerola a una concentración de 1 mg/ml se ilustra en la Figura 21, donde se observa una liberación rápida durante los primeros 30 minutos, seguido de una liberación sostenida durante las siguientes 6 h hasta alcanzar un porcentaje del 49% de la cantidad total del extracto cargado en la matriz del hidrogel. El alto grado de hinchamiento contribuyen a la liberación del fármaco en el medio mediante la disolución del fármaco.

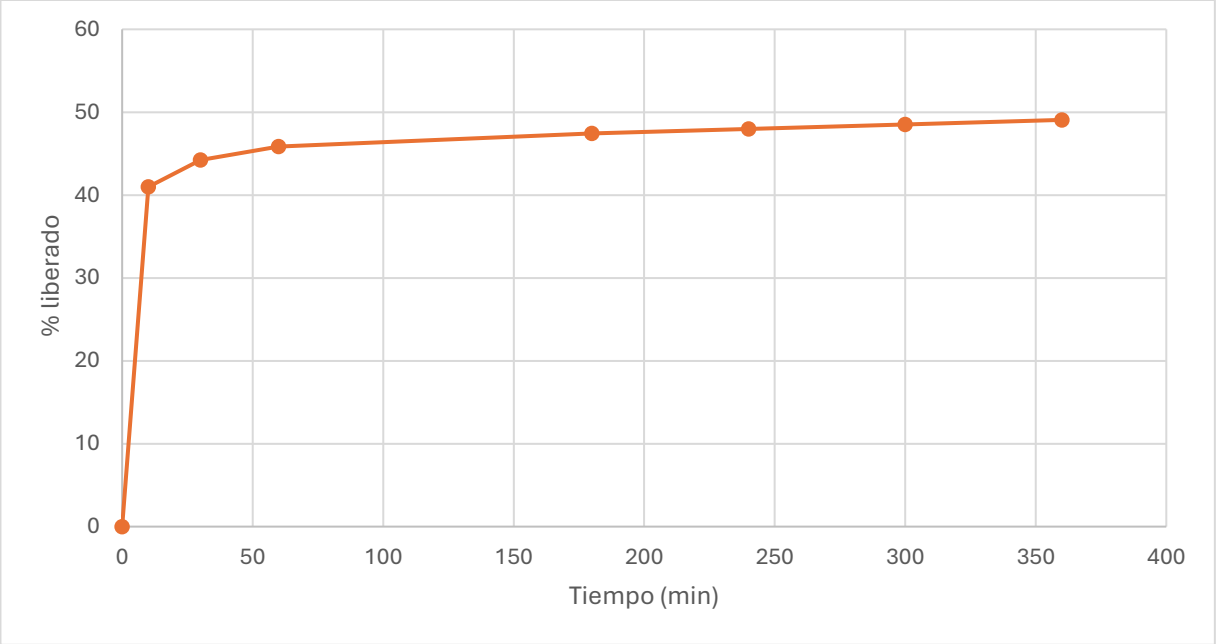


Figura 21. Perfil de liberación para el hidrogel cargado con extracto de acerola.

El perfil de liberación se ajustó a diferentes modelos como se muestra en la Tabla 6. para analizar el mecanismo de liberación que gobierna el hidrogel desarrollado y se determinó un mejor ajuste para el modelo de Korsmeyer-Peppas (ver ecuación 7) con un R^2=0,9858 y un K_{KP} =0,1748. El modelo de Korsmeyer-Peppas describe la difusión de un soluto o fármaco en una matriz polimérica hinchable, que conforme absorbe disolvente, libera el soluto cargado mientras la matriz se disuelve [52]. A partir del valor de n=0,054 se determinó que el mecanismo que gobierna el sistema de administración corresponde a difusión de Ficks [52]. Se tiene una liberación lenta asociada a una baja porosidad en la matriz del hidrogel, lo cual se corrobora con la morfología observada mediante las imágenes de SEM.

Tabla 6. Parámetros de ajuste de distintos modelos matemáticos para el perfil de liberación de extracto de acerola.

Orden cero		Primer orden		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
K_0	R^2	K_1	R^2	K_H	R^2	K_{KP}	R^2	n
0,045	0,8771	0,0004	0,8893	0,5028	0,9465	0,1748	0,9858	0,054

4.7. Microscopía electrónica de barrido

Se tomaron imágenes mediante SEM con el objetivo de analizar la morfología de los hidrogeles impresos como se muestra en la Figura 22. Se determinó que el hidrogel no cuenta con una estructura porosa, ya que se observa una superficie lisa en su totalidad, similar a morfologías obtenidas por otros autores como Baykara *et al.* [11]. También se observó la presencia de microfisuras (ver flecha roja), debido a que al aplicar vacío durante el liofilizado la pieza se contrae generando estrés en la superficie del hidrogel.

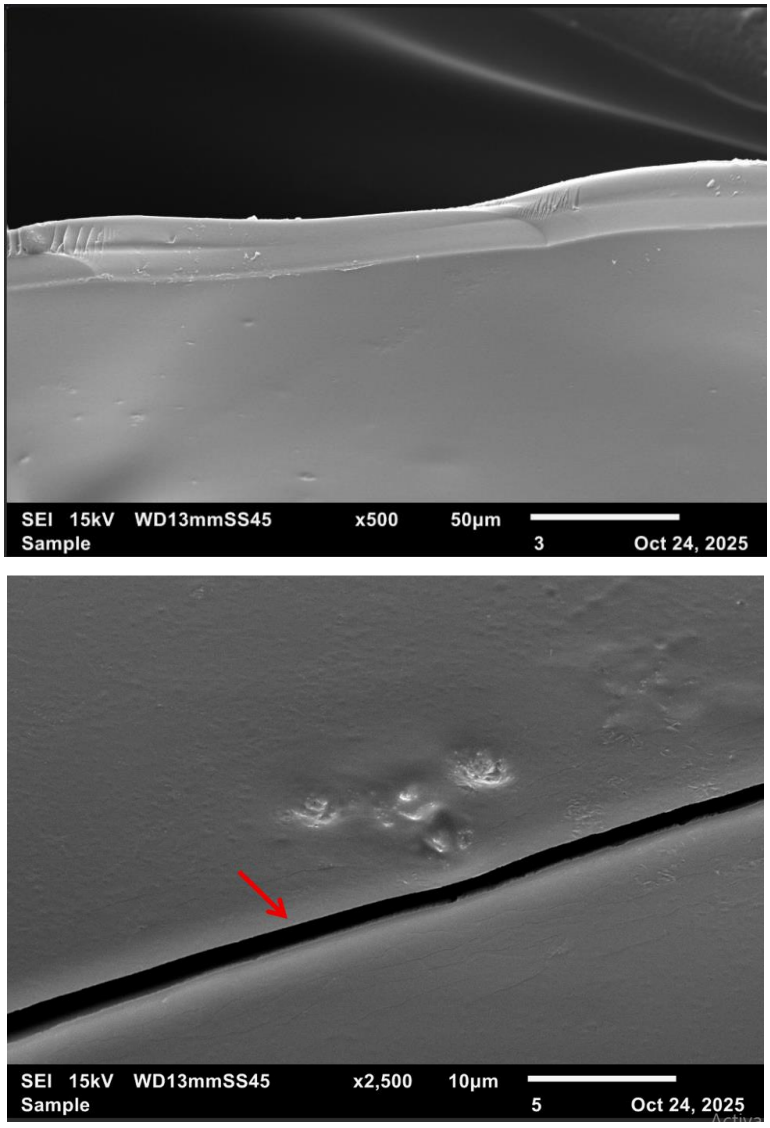


Figura 22. Morfología del hidrogel de gelatina funcionalizada fabricado mediante impresión 3D.

4.8. Análisis de costos

Para realizar el análisis económico del proyecto se evaluaron los costos asociados a la metacrilación de la gelatina y al proceso de impresión 3D considerando los gastos asociados a la materia prima, consumo energético de los equipos y mano de obra para obtener el costo unitario para 1 mL de resina. Para los cálculos de consumo eléctrico y mano de obra se utilizaron datos de la Compañía Nacional de Fuerza y Luz (CNFL) y del Ministerio de Trabajo y Seguridad Social. En la sección de Anexos se muestra el desglose para cada uno de los rubros.

4.8.1. Metacrilación de gelatina

A continuación, se muestran los costos asociados al proceso de metacrilación en la Tabla 7 considerando que, a partir de 5 g de gelatina se recuperan 4,35 g luego de la metacrilación.

Tabla 7. Desglose de costos para la metacrilación de gelatina.

Rubro	Costo (₡)
Reactivos	1040
Consumo energético	15765
Mano de obra	13767
Costo unitario por gramo de gelatina funcionalizada	**7027**

A partir del costo unitario por gramo de gelatina funcionalizada de ₡ 7027,81 se determinó el costo por mL de la formulación de la resina líquida para obtener los hidrogeles mediante impresión 3D como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Desglose de costos de la resina líquida para impresión 3D.

Rubro	Costo (₡)
Reactivos	7374
Consumo energético	14,35
Mano de obra	13767
Costo por ml de resina líquida	**2127**

5. **Conclusiones**

Se establecieron protocolos para la reacción de metacrilación de la gelatina, la preparación de la tinta y el proceso de impresión 3D para la formulación que presentó un menor tiempo de curado con los parámetros óptimos de impresión [Objetivo 1].

Se desarrolló una formulación para producir hidrogeles de gelatina funcionalizada al 10% m/m con riboflavina al 0.2% m/m y l-arginina al 10% m/m como sistema de fotoiniciación. Se determinó un tiempo de curado de 30 minutos aproximadamente. Se obtuvo impresiones con alta precisión utilizando un tiempo de exposición por capa de 200 s y un espesor de 50 um. Se imprimieron exitosamente discos de 6 mm de diámetro y 1 mm de espesor [Objetivo 2].

Mediante la medición de los espectros de resonancia magnética nuclear para la gelatina antes y después de la metacrilación se confirmó la sustitución de la lisina por el metacrilato, mediante la presencia de nuevos picos a 5,4 y 5,6 ppm correspondientes a los protones pertenecientes al doble enlace de los grupos metacrilato unidos a la lisina e hidroxilisina, la señal a 1,8 correspondiente al metilo del metacrilico y la reducción de la intensidad del pico de lisina a 2,9 ppm [Objetivo 3].

Mediante FTIR se detectaron señales correspondientes a las amidas I, II y III a 1637, 1550 y 1240 cm^{-1} para la gelatina y la gelatina funcionalizada. Se confirmó el entrecruzamiento del hidrogel mediante la reducción en la intensidad correspondiente a esos picos. Se llevaron a cabo mediciones para el espectro del extracto de acerola y para el hidrogel cargado donde se observó que el hidrogel puede encapsular el extracto de manera efectiva, manteniendo la estabilidad química del principio activo, mediante la conservación de los picos correspondientes a los enlaces cíclicos C-O-C de la lactona a 1076 y 1018 cm^{-1} [Objetivo 3].

La caracterización reológica de la resina líquida confirmó la capacidad de ser utilizada en impresión 3D mediante las mediciones de viscosidad. Para el hidrogel curado se determinó un módulo de almacenamiento de 0,147 kPa, mostrando un comportamiento elástico hasta una tasa

de cizallamiento de 524%, lo que indica suficiente tenacidad para ser fácilmente manipulado [Objetivo 3].

La medición del grado de hinchamiento permitió cuantificar la capacidad de absorber líquidos del hidrogel, donde se observó un aumento abrupto durante los primeros 10 minutos y se alcanzó un grado de hinchamiento en equilibrio de 345% tras 24 h de terminar el ensayo. El grado de hinchamiento obtenido es ideal para la liberación controlada de fármacos, ya que permite la absorción de los fluidos del medio que da lugar a la difusión del fármaco en el medio [Objetivo 3].

Respecto al perfil de liberación controlada se demostró que el hidrogel es capaz de suministrar el extracto de acerola de manera sostenida a través del tiempo. Se determinó que el mejor modelo de ajuste corresponde al de Korsmeyer-Peppas, con un valor de R^2=0,9858, con un K_{KP} =0,1748 y un valor de n=0,054 que corresponde a un sistema gobernado por difusión [Objetivo 3].

Mediante las imágenes de SEM se observó que los hidrogeles impresos tienen una estructura libre de poros y se observaron leves fisuras provenientes del proceso de liofilizado. La morfología observada se podría relacionar con el modelo de ajuste de Korsmeyer-Peppas, ya que la falta de porosidad daría lugar a que solamente se dé la liberación por difusión [Objetivo 3].

Respecto al análisis de costos se determinó que la producción del hidrogel mediante impresión 3D tendría un costo de ₡ 2127 / ml considerando costos asociados a los materiales, consumo energético y mano de obra [Objetivo 4].

6. **Referencias bibliográficas**

[1] E. M. Maines, M. K. Porwal, C. J. Ellison, and T. M. Reineke, "Sustainable advances in SLA/DLP 3D printing materials and processes," *Green Chemistry* (23) 18, 6863–6897, 2021, doi: 10.1039/D1GC01489G.

[2] J. Alipal, N.A.S. Mohd Pu'ad, T. C. Lee, N. H. M. Nayam, N. Sahari, H. Basri, M. I. Idris, and H. Z. Abdullah "A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation," *Mater Today Proc*, (42) 240–250, 2021, doi: 10.1016/j.matpr.2020.12.922.

[3] A. B. Bello, D. Kim, D. Kim, H. Park, and S.-H. Lee, "Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications," *Tissue Eng Part B Rev* (26) 2, 164–180, Apr. 2020, doi: 10.1089/ten.teb.2019.0256.

[4] O. V. Mikhailov, "Gelatin as It Is: History and Modernity," *Int J Mol Sci*, (24) 4, 3583, Feb. 2023, doi: 10.3390/ijms24043583.

[5] F. Milano, A. Masi, M. Madaghiele, A. Sannino, L. Salvatore, and N. Gallo, "Current Trends in Gelatin-Based Drug Delivery Systems," *Pharmaceutics* (15) 5, 1499, May 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15051499.

[6] B. Lee, N. Lum, L. Seow, P. Lim, and L. Tan, "Synthesis and Characterization of Types A and B Gelatin Methacryloyl for Bioink Applications," *Materials*, (9) 10, 797, Sep. 2016, doi: 10.3390/ma9100797.

[7] F. Ji, W. Zhou, Z. Zhang, and B. Zhang, "Effects of Relative Molecular Weight Distribution and Isoelectric Point on the Swelling Behavior of Gelatin Films," *Front Chem*, (10), May 2022, doi: 10.3389/fchem.2022.857976.

[8] P. Sengupta, E. Salisbury, A. Kumar, T. Junkers, and N. R. Cameron, "Production of gelatin methacrylate by flow chemistry and investigation of its suitability as a biomaterial," *RSC Applied Polymers* (3) 5, 1204–1215, 2025, doi: 10.1039/D5LP00078E.

[9] M. Watanabe, H. Li, M. Yamamoto, J. Horinaka, Y. Tabata, and A. W. Flake, "Addition of glycerol enhances the flexibility of gelatin hydrogel sheets; application for in utero tissue

engineering," *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* (109) 6, 921–931, Jun. 2021, doi: 10.1002/jbm.b.34756.

[10] P. Shukla, M. Mitruka, and F. Pati, "The effect of the synthetic route on the biophysiochemical properties of methacrylated gelatin (GelMA) based hydrogel for development of GelMA-based bioinks for 3D bioprinting applications," *Materialia (Oxf)*, (25), 101542, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.mtla.2022.101542.

[11] D. Baykara, T. Bedir, E. Ilhan, M. E. Mutlu, O. Gundhuz, R. Nayaran, and C. B. Ustundag *ponga todos los autores* "Fabrication and optimization of 3D printed gelatin methacryloyl microneedle arrays based on vat photopolymerization," *Front Bioeng Biotechnol* (11), Apr. 2023, doi: 10.3389/fbioe.2023.1157541.

[12] I. Machado, C. F. Marques, E. Martins, A. L. Alves, R. L. Reis, and T. H. Silva, "Marine Gelatin-Methacryloyl-Based Hydrogels as Cell Templates for Cartilage Tissue Engineering," *Polymers (Basel)* (15) 7, 1674, Mar. 2023, doi: 10.3390/polym15071674.

[13] A. I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, and H. Berghmans, "Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels," *Biomacromolecules* (1) 1, 31–38, Mar. 2000, doi: 10.1021/bm990017d.

[14] H. Shirahama, B. H. Lee, L. P. Tan, and N.-J. Cho, "Precise Tuning of Facile One-Pot Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesis," *Sci Rep* (6) 1, 31036, Aug. 2016, doi: 10.1038/srep31036.

[15] D. Falcone, "Synthesis and Characterization of Printable Bioinks: Gelatin Methacrylate Composite Hydrogels for 3D Culture," UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA, 2021.

[16] P. Shukla, M. Mitruka, and F. Pati, "The effect of the synthetic route on the biophysiochemical properties of methacrylated gelatin (GelMA) based hydrogel for development of GelMA-based bioinks for 3D bioprinting applications," *Materialia (Oxf)* (25), 101542, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.mtla.2022.101542.

[17] Y. Piao, H. You, T. Xu, H. Bei, I. Z. Piwko, Y. Y. Kwan, and X Zhao., "Biomedical applications of gelatin methacryloyl hydrogels," *Engineered Regeneration* (2), 47–56, 2021, doi: 10.1016/j.engreg.2021.03.002.

[18] L. Xiang and W. Cui, "Biomedical application of photo-crosslinked gelatin hydrogels," *Journal of Leather Science and Engineering* (3) 1, 3, Dec. 2021, doi: 10.1186/s42825-020-00043-y.

[19] R. Palucci Rosa, G. Rosace, R. Arrigo, and G. Malucelli, “Preparation and Characterization of 3D-Printed Biobased Composites Containing Micro- or Nanocrystalline Cellulose,” *Polymers (Basel)* (14) 9, 1886, May 2022, doi: 10.3390/polym14091886.

[20] F. Dehli, O. Schless, M. Kalisske, I. Pothoff, A. Taum, M. Fuest, and D. Duarte Campos , “Biobased photocrosslinkable gelatin-methacrylate hydrogels promote the growth and phenotype maintenance of human corneal keratocytes,” *Mater Adv* (6) 12, 3805–3816, 2025, doi: 10.1039/D5MA00076A.

[21] R. N. Ghosh, J. Thomas, V. B. R. Vaidehi, D. N. G. Devi, A. Janardanan, P. K. Namboothiri, and M. Peter, “An insight into synthesis, properties and applications of gelatin methacryloyl hydrogel for 3D bioprinting,” *Mater Adv* (4) 22, 5496–5529, 2023, doi: 10.1039/D3MA00715D.

[22] H. Yin, M. Zhu, Y. Wang, L. Luo, Q. Ye, and B. H. Lee, “Physical properties and cellular responses of gelatin methacryloyl bulk hydrogels and highly ordered porous hydrogels,” *Frontiers in Soft Matter* (2), Jan. 2023, doi: 10.3389/frsfm.2022.1101680.

[23] H. Xu, J. Casillas, S. Krishnamoorthy, and C. Xu, “Effects of Irgacure 2959 and lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate on cell viability, physical properties, and microstructure in 3D bioprinting of vascular-like constructs,” *Biomedical Materials* (15) 5, 055021, Aug. 2020, doi: 10.1088/1748-605X/ab954e.

[24] D. E. Ciolacu, R. Nicu, and F. Ciolacu, “Cellulose-Based Hydrogels as Sustained Drug-Delivery Systems,” *Materials* (13) 22, 5270, Nov. 2020, doi: 10.3390/ma13225270.

[25] W. Feng and Z. Wang, “Tailoring the Swelling-Shrinkable Behavior of Hydrogels for Biomedical Applications,” *Advanced Science* (10) 28, Oct. 2023, doi: 10.1002/advs.202303326.

[26] J. Saviola, “The FDA’s role in medical device clinical studies of human subjects,” *J Neural Eng* (2) 1, S1–S4, Mar. 2005, doi: 10.1088/1741-2560/2/1/001.

[27] M. Lang, S. Hirner, F. Wiesbrock, and P. Fuchs, “A Review on Modeling Cure Kinetics and Mechanisms of Photopolymerization,” *Polymers (Basel)* (14) 10, 2074, May 2022, doi: 10.3390/polym14102074.

[28] S. Bupphathong, C. Quiroz, W. Huang, P.-F. Chung, H.-Y. Tao, and C.-H. Lin, “Gelatin Methacrylate Hydrogel for Tissue Engineering Applications—A Review on Material Modifications,” *Pharmaceuticals* (15) 2, 171, Jan. 2022, doi: 10.3390/ph15020171.

[29] M. M. Abdul-Monem, “Naturally Derived Photoinitiators for Dental and Biomaterials Applications,” *European Dental Research and Biomaterials Journal* (1) 02, 72–78, Jul. 2020, doi: 10.1055/s-0040-1721313.

[30] S. M. Müller, S. Schlögl, T. Wiesner, M. Haas, and T. Griesser, “Recent Advances in Type I Photoinitiators for Visible Light Induced Photopolymerization,” *ChemPhotoChem* (6) 11, Nov. 2022, doi: 10.1002/cptc.202200091.

[31] C. Wang, J. Chen, and J. Wang, “The selection of photoinitiators for photopolymerization of biodegradable polymers and its application in digital light processing additive manufacturing,” *J Biomed Mater Res A* (110) 1, 204–216, Jan. 2022, doi: 10.1002/jbm.a.37277.

[32] W. Tomal and J. Ortyl, “Water-Soluble Photoinitiators in Biomedical Applications,” *Polymers (Basel)* (12) 5, 1073, May 2020, doi: 10.3390/polym12051073.

[33] U. P. Kappes, D. Luo, M. Potter, K. Schulmeister, and T. M. Rünger, “Short- and Long-Wave UV Light (UVB and UVA) Induce Similar Mutations in Human Skin Cells,” *Journal of Investigative Dermatology* (126) 3, 667–675, Mar. 2006, doi: 10.1038/sj.jid.5700093.

[34] A. K. Nguyen, P. L. Goering, R. K. Elespuru, S. Sarkar Das, and R. J. Narayan, “The Photoinitiator Lithium Phenyl (2,4,6-Trimethylbenzoyl) Phosphinate with Exposure to 405 nm Light Is Cytotoxic to Mammalian Cells but Not Mutagenic in Bacterial Reverse Mutation Assays,” *Polymers (Basel)* (12) 7, 1489, Jul. 2020, doi: 10.3390/polym12071489.

[35] Y. B. Lee, S. Lim, Y. Lee, C. H. Park, and H. J. Lee, “Green Chemistry for Crosslinking Biopolymers: Recent Advances in Riboflavin-Mediated Photochemistry,” *Materials* (16) 3, 1218, Jan. 2023, doi: 10.3390/ma16031218.

[36] K. Wang, W. Wang, X. Wu, J. Xiao, Y. Liu, and A. Liu, “Effect of photochemical UV/riboflavin-mediated cross-links on different properties of fish gelatin films,” *J Food Process Eng* (40) 5, Oct. 2017, doi: 10.1111/jfpe.12536.

[37] C. Vazquez-Martel, P. Mainik, and E. Blasco, “Natural and Naturally Derived Photoinitiating Systems for Light-Based 3D Printing,” *Organic Materials* (4) 04, 281–291, Dec. 2022, doi: 10.1055/a-1976-0453.

[38] T. Pavlovska and R. Cibulka, “Structure and Properties of Flavins,” in *Flavin-Based Catalysis*, Wiley, 2021, 1–27. doi: 10.1002/9783527830138.ch1.

[39] S. Kim and C.-C. Chu, “Visible light induced dextran-methacrylate hydrogel formation using (−)-riboflavin vitamin B2 as a photoinitiator and L-arginine as a co-initiator,” *Fibers and Polymers* (10) 1, 14–20, Feb. 2009, doi: 10.1007/s12221-009-0014-z.

[40] A. K. Nguyen, S. D. Gittard, A. Koroleva, S. Schlie, A. Gaidukeviciute, B.N. Chichkov, and R. J. Narayan, “Two-Photon Polymerization of Polyethylene Glycol Diacrylate Scaffolds with Riboflavin and Triethanolamine used as a Water-Soluble Photoinitiator,” *Regenerative Med*, vol. 8, no. 6, pp. 725–738, Nov. 2013, doi: 10.2217/rme.13.60.

[41] S. Kim and C. Chu, “Fabrication of a biodegradable polysaccharide hydrogel with riboflavin, vitamin B2, as a photo-initiator and <scp>L</scp> -arginine as coinitiator upon UV irradiation,” *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* (91B) 1, 390–400, Oct. 2009, doi: 10.1002/jbm.b.31414.

[42] P. Maier, T. Reinhard, and M. Kohlhaas, “Corneal Collagen Cross-Linking in the Stabilization of Keratoconus,” *Dtsch Arztebl Int*, Mar. 2019, doi: 10.3238/arztebl.2019.0184.

[43] N. V. Arguchinskaya, E. E. Beketov, E. V. Isaeva, A. A. Kisel, P. S. Eremin, S. A. Ivanov, P. V. Shegay, and A. D. Kaprin, “Riboflavin-Induced Photocrosslinking of Highly Concentrated Collagen: Printing Accuracy, Degradation Time, and Cytocompatibility,” *Appl Biochem Microbiol* (59) 8, 1062–1070, Dec. 2023, doi: 10.1134/S0003683823080033.

[44] M. Pagac, J. Hajnys, Q. P. Ma, L. Jancar, J. Jansa, P. Stefek, and J. Mesicek, “A Review of Vat Photopolymerization Technology: Materials, Applications, Challenges, and Future Trends of 3D Printing,” *Polymers (Basel)* (13) 4, 598, Feb. 2021, doi: 10.3390/polym13040598.

[45] V. Manish, A. Arockiarajan, and G. Tamadapu, “Influence of water content on the mechanical behavior of gelatin based hydrogels: Synthesis, characterization, and modeling,” *Int J Solids Struct* (233), 111219, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.ijsolstr.2021.111219.

[46] X. Hu, C. Zhang, Y. Xiong, S. Ma, C. Sun, and W. Xu, “A review of recent advances in drug loading, mathematical modeling and applications of hydrogel drug delivery systems,” *J Mater Sci* (59) 32, 15077–15116, Aug. 2024, doi: 10.1007/s10853-024-10103-x.

[47] L. Lei, Y. Bai, X. Qin, J. Liu, W. Huang, and Q. Lv, “Current Understanding of Hydrogel for Drug Release and Tissue Engineering,” *Gels* (8) 5, 301, May 2022, doi: 10.3390/gels8050301.

[48] C.-S. Lee and H. S. Hwang, “Starch-Based Hydrogels as a Drug Delivery System in Biomedical Applications,” *Gels* (9) 12, 951, Dec. 2023, doi: 10.3390/gels9120951.

[49] D. E. Ciolacu, R. Nicu, and F. Ciolacu, “Cellulose-Based Hydrogels as Sustained Drug-Delivery Systems,” *Materials* (13) 22, 5270, Nov. 2020, doi: 10.3390/ma13225270.

[50] S. Adepu and S. Ramakrishna, “Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions,” *Molecules* (26) 19, 5905, Sep. 2021, doi: 10.3390/molecules26195905.

[51] X. Hu, C. Zhang, Y. Xiong, S. Ma, C. Sun, and W. Xu, “A review of recent advances in drug loading, mathematical modeling and applications of hydrogel drug delivery systems,” *J Mater Sci* (59) 32, 15077–15116, Aug. 2024, doi: 10.1007/s10853-024-10103-x.

[52] J. Long, A. E. Etxeberria, A. V. Nand, C. R. Bunt, S. Ray, and A. Seyfoddin, “A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery,” *Materials Science and Engineering: C* (104), 109873, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109873.

[53] Y. Hu, Z. Luo, and Y. Bao, “Trends in Photopolymerization 3D Printing for Advanced Drug Delivery Applications,” *Biomacromolecules* (26) 1, 85–117, Jan. 2025, doi: 10.1021/acs.biomac.4c01004.

[54] E. R. Ghomi, M. Shakiba, A. S. Ardahaei, M. A. Kenari, M. Faraji, S. Ataei, P. Kohansal, I. Jafari, M. Abdouss, and S. Ramakrishna, “Innovations in Drug Delivery for Chronic Wound Healing,” *Curr Pharm Des* (28) 5, 340–351, Feb. 2022, doi: 10.2174/1381612827666210714102304.

[55] P. Szatkowski, Z. Flis, A. Ptak, and E. Molik, “Hydrogel Dressing Biomaterial Enriched with Vitamin C: Synthesis and Characterization,” *Int J Mol Sci* (25) 19, 10565, Sep. 2024, doi: 10.3390/ijms251910565.

[56] H. Erkus, T. Bedir, E. Kaya, G. B. Tinaz, O. Gunduz, M. -C. Chifiriuc, and C. B. Ustundag “Innovative transdermal drug delivery system based on amoxicillin-loaded gelatin methacryloyl microneedles obtained by 3D printing,” *Materialia (Oxf)* (27), 101700, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.mtla.2023.101700.

[57] R. Goto, E. Nishida, S. Kobayashi, M. Aino, T. Ohno, Y. Iwamura, T. Kikuchi, J.-i. Hayashi, G. Yamamot, M. Asakura, and A. Mitani, “Gelatin Methacryloyl–Riboflavin

(GelMA–RF) Hydrogels for Bone Regeneration," *Int J Mol Sci* (22) 4, 1635, Feb. 2021, doi: 10.3390/ijms22041635.

[58] S. Fu, L. Zhou, P. Zeng, and S. Fu, "Antibacterial Chitosan-gelatin Hydrogel Beads Cross-linked by Riboflavin under Ultraviolet A Irradiation," *Fibers and Polymers* (23) 2, 315–320, Feb. 2022, doi: 10.1007/s12221-021-0401-7.

[59] Y. Ma, L. Xin, H. Tan, M. Fan, J. Li, Y. Jia, Z. Ling, Y. Chen, and X. Hu, "Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing," *Materials Science and Engineering: C* (81), 522–531, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.08.052.

[60] J. D. O. da Silva, D. E. L. Santos, A. K. de S. Abud, and A. M. de Oliveira, "Characterization of acerola (Malpighia emarginata) industrial waste as raw material for thermochemical processes," *Waste Management* (107), 143–149, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.wasman.2020.03.037.

[61] C. Yohannan Panicker, H. Tresa Varghese, and D. Philip, "FT-IR, FT-Raman and SERS spectra of Vitamin C," *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* (65) 3–4, 802–804, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.saa.2005.12.044.

[62] F. Ji, W. Zhou, Z. Zhang, and B. Zhang, "Effects of Relative Molecular Weight Distribution and Isoelectric Point on the Swelling Behavior of Gelatin Films," *Front Chem*, (10), May 2022, doi: 10.3389/fchem.2022.857976.

7. **Anexos**

7.1. Protocolo de metacrilación

I Parte. Síntesis

Inicialmente, se prepara una solución tampón carbonato-bicarbonato 0.25 M con un pH de 9.62 agregando 0.398 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y 0.735 g de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) en un balón aforado de 50 mL.

-En un beaker de 50 mL con la solución buffer, agregar 5 g de gelatina a 50°C con agitación magnética constante (600 rpm) (preferiblemente calentar en baño maría). Medir pH y en caso de ser necesario ajustar el valor a 9.2.

-Seguidamente se agregan 500 µL de anhidro metacrilico (0.1 mL por cada gramo de gelatina) y se deja reaccionar durante 3 h, manteniendo la temperatura y la agitación. Cubrir el beaker con papel aluminio para protegerlo de la luz.

-Una vez transcurrido el tiempo, se añade ácido clorhídrico hasta obtener un pH de 7.4

II Parte. Purificación

-Se transfieren 50 mL de la solución previamente preparada a uno o dos tubos flexibles de membrana de diálisis de acetato de celulosa (corte de peso molecular de 12–14 kDa).

-Para trasvasar la solución se coloca la prensa de diálisis a un extremo del tubo, se vierte la solución con ayuda de un embudo o pipeta serológica que facilite el trasvase y luego se coloca una prensa en el otro extremo, dejando una burbuja de aire dentro del tubo.

-Se lleva a cabo sumergiendo el tubo en su totalidad en un volumen de 1.5 L de agua destilada a 40°C durante 3 días y se cambia el agua una vez al día.

-La solución se trasvasa a dos tubos Falcon de 50 mL llenando la mitad de cada uno, tapándolos con papel *Parafilm* y se guardan en un congelador para liofilizar durante 2 días.

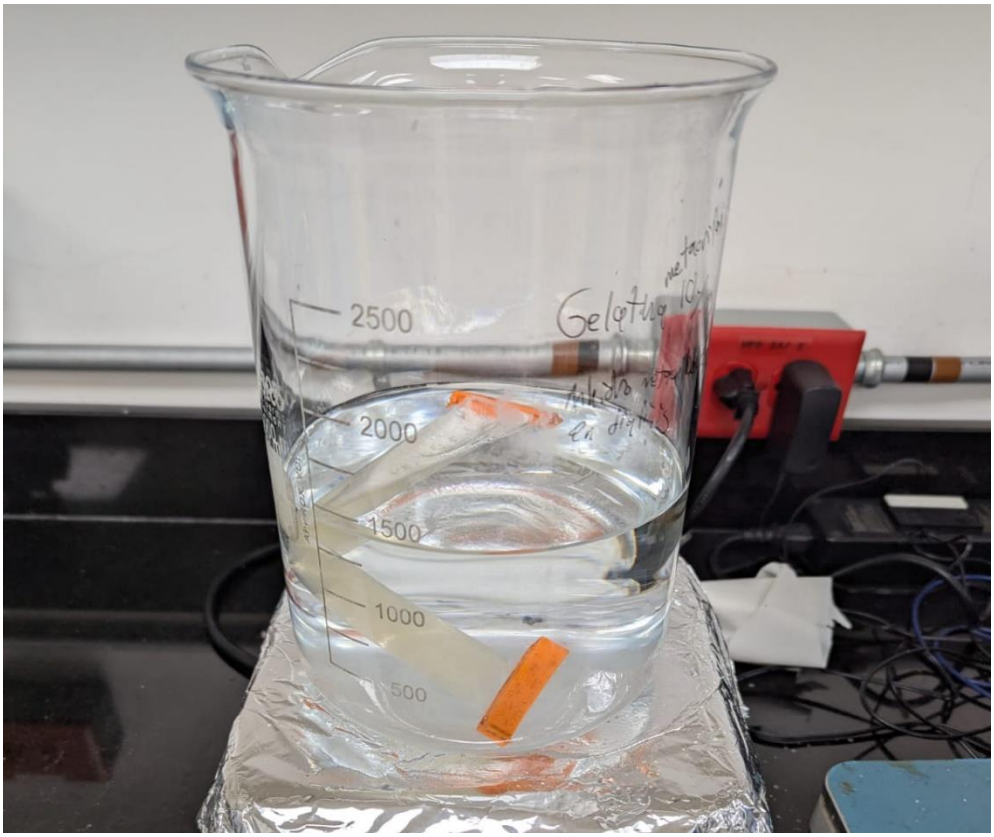


Figura A1. Membrana de diálisis en plantilla eléctrica.

7.2. Protocolo de impresión 3D

I Parte. Preparación de la resina líquida

-En un beaker de 50 mL cubierto con papel aluminio se prepara una solución de GelMA al 10% m/v en PBS agregando 1 g de GelMA en 10 mL de PBS a 40°C bajo agitación magnética (300 rpm) durante 30 minutos hasta que se disuelva por completo.

-Luego se agregan 2 mg de riboflavina, 100 mg de L-arginina manteniendo la agitación durante 10 minutos y por último se lleva la solución a temperatura ambiente.

II Parte. Prueba de entrecruzamiento

Previo a la impresión en 3D es necesario llevar a cabo una prueba inicial de curado bajo la exposición a una lámpara UV (405 nm).

-Con ayuda de una micropipeta se vierten 100 µL en una placa Petri y se coloca en la cámara de curado por un tiempo definido (120 min). Verifique el avance del curado en intervalos de 5 min y registre el inicio de la gelificación, cambio de color y tiempo final de curado.

III Parte. Impresión 3D

Abrir el archivo STL en el software *Anycubic Photon Workshop* y en la sección de *Slice Parameters* seleccionar los siguientes parámetros:

- Espesor de capa: 0.050 mm
- Tiempo de exposición de normal: 200 s
- Intervalo de apagado (*Off time*): 0.5 s
- Tiempo de exposición de fondo: 200 s
- Capas de fondo: 4

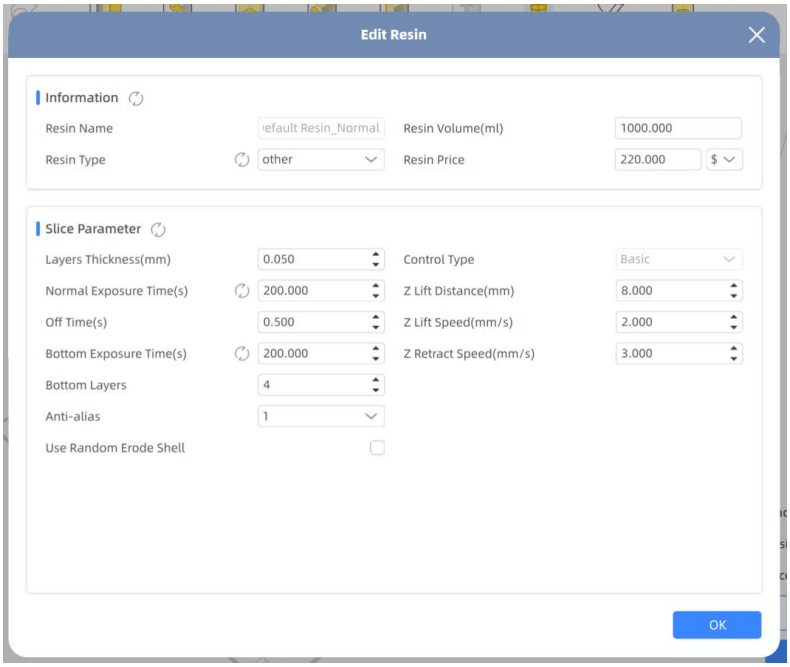


Figura A2. Selección de parámetros de impresión.

-Una vez se tienen listos los parámetros de impresión se escoge la opción de Save Slice File y se guarda el archivo en una llave USB.

-Introducir la llave USB a la impresora.

-Antes de imprimir se debe limpiar el fondo del tanque y la plataforma móvil con isopropanol y toallas *kimwipes.*

-Se vierten los 10 mL de resina líquida en el tanque.

-Seleccione la opción “Print” y escoja el modelo deseado a imprimir.

-Una vez transcurrido el tiempo de impresión retire la plataforma móvil aflojando el tornillo negro en la parte de arriba y retire la pieza impresa con ayuda de una espátula metálica.

7.3. Protocolo de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

-Encender computadora e iniciar sesión.

-Abrir el software OMNIC Specta.

-Levantar el brazo metálico del equipo accionando la rosca integrada, retirar la toalla *kimwipe* y limpiar el detector y la punta del brazo con una toalla *kimwipe* e isopropanol al 70%. Luego secar el detector con otra toalla.

-Con el comando *Col Bkg* registrar la señal de fondo.

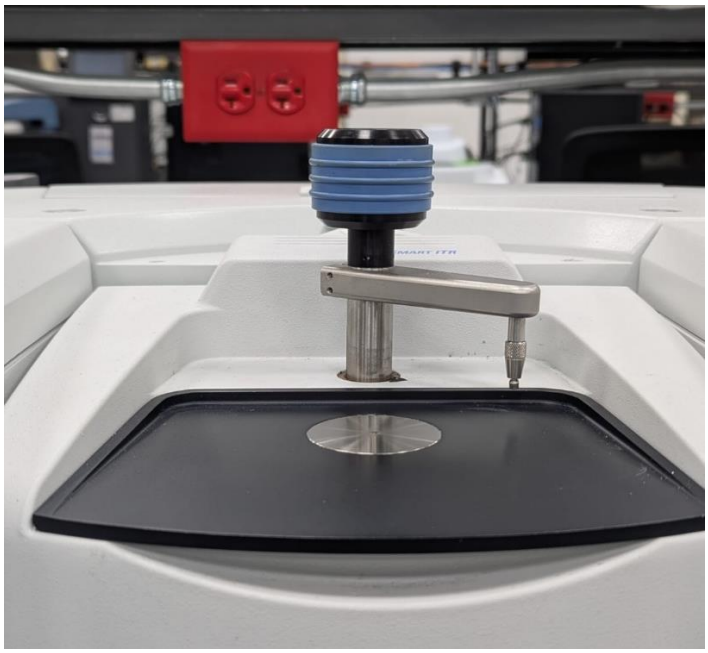


Figura A3. Posición del brazo metálico durante la recolección de fondo.

-Luego se debe colocar la muestra cubriendo por completo el detector y bajar el brazo metálico accionando la rosca hasta sentir una leve presión.

-Con el comando *Col Sample* medir el espectro.

-Guardar el archivo con el nombre, formato y carpeta respectiva.

-Limpiar el detector y la punta del brazo con una toalla *kimwipe* e isopropanol al 70%. Luego secar el detector con otra toalla.

-Por último, colocar una toalla doblada en cuatro sobre el detector y bajar el brazo metálico hasta sentir una leve presión.

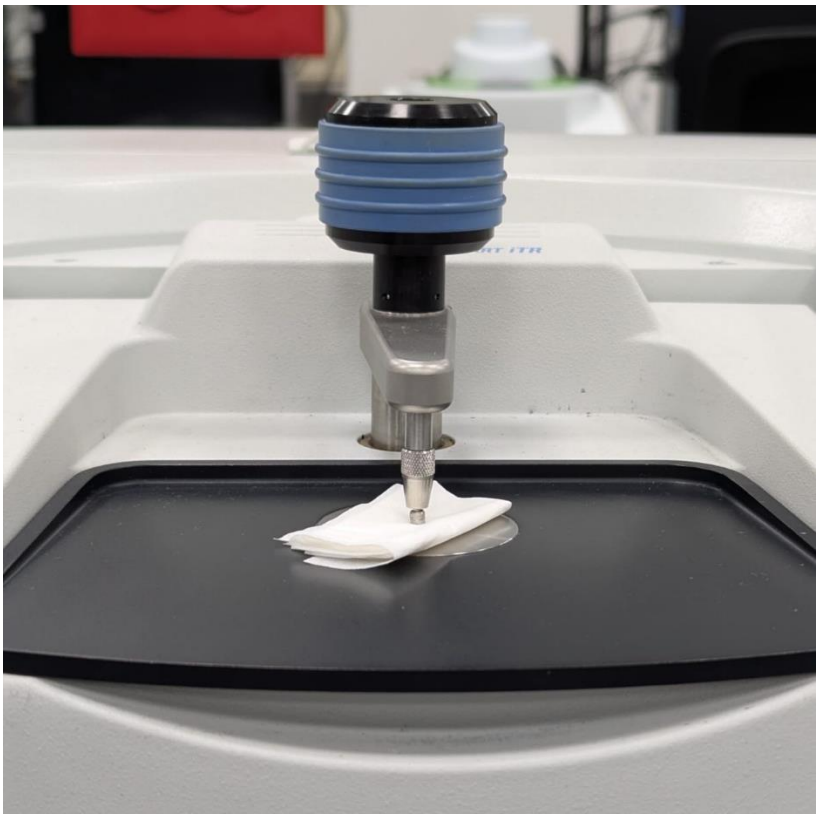


Figura A4. Posición del brazo durante la medición y luego de utilizar el equipo.

-Apagar la computadora.

Nota: El equipo siempre se mantiene encendido.

7.4. H-NMR

-En dos beakers separados, colocar 10 mg de gelatina y 10 mg de gelatina metacrilada.

-Agregar 1 mL de agua deuterada a cada beaker con ayuda de una pipeta Pasteur.

-Extraer una alícuota con una pipeta Pasteur diferente para cada solución y trasvasar a tubos de NMR.

-Colocar el tubo en el holder, asegurando que el volumen sobrepase la línea marcada en el holder.

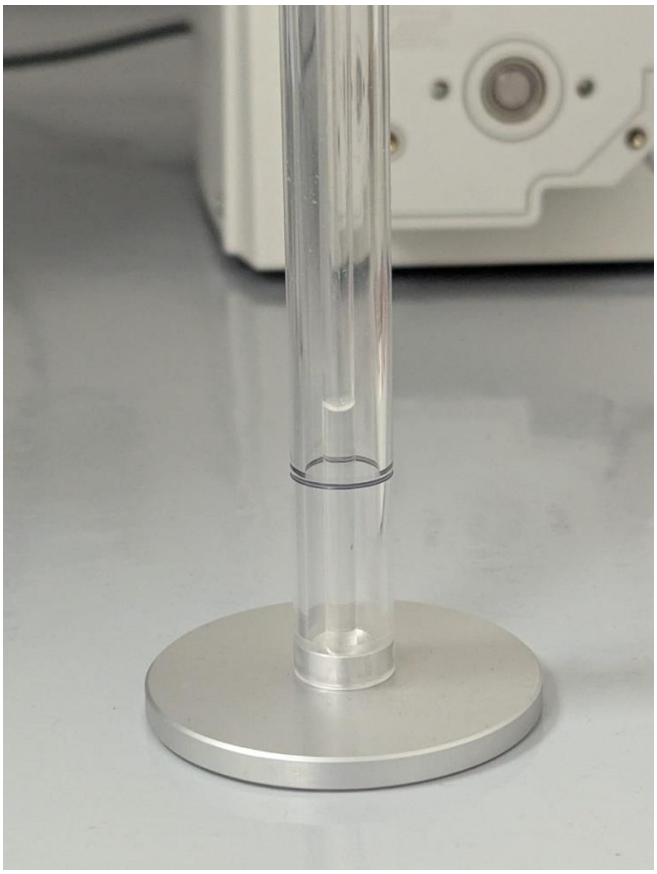


Figura A5. Tubo de NMR en el holder.

-Seleccionar los siguientes parámetros para la medición:

- Fuente: 1D Extended+
- Solvente: Agua deuterada
- Escaneos: 128

- Tiempo de adquisición: 1,6 s
- Tiempo de repetición: 4 s
- Ángulo de pulso: 90°

-Colocar el tubo en el equipo y seleccionar la opción de *Start* para hacer la medición.

Nota: Usar una pipeta distinta para cada volumen y tener cuidado de no confundirlas (una para el agua deuterada, otra para la gelatina y otra para la gelatina metacrilada).

7.5. Grado de hinchamiento

7.5.1. Protocolo para grado de hinchamiento

-Medir la masa inicial de la muestra de hidrogel en una balanza analítica.

-Sumergir la muestra en 50 mL de PBS (1X, pH=7.14).

-Luego de un tiempo determinado extraer la muestra cuidadosamente y secar el exceso de agua con un papel o toalla absorbente.

-Medir la masa de la muestra a un tiempo determinado después del inicio del ensayo y volver a sumergir en el medio.

-Calcular el grado de hinchamiento y graficar los resultados.

-Las mediciones de masa se deben realizar en los siguientes intervalos para obtener la curva del hinchamiento en función del tiempo: 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 2 h, 24 h

7.5.2. Datos experimentales para grado de hinchamiento

Tabla A1. Valores de masa para la determinación del grado de hinchamiento

Tiempo	**Masa (g)**		
	Muestra 1	**Muestra 2**	**Muestra 3**
0	7,2	6,1	8,2
10	24,8	29,6	28,3
20	29,8	31,6	36,6
30	29,9	31,5	40,1
60	30,4	30,3	41,4
120	29,4	30	40,3
180	28,5	29	41,7
1440	28,1	28,8	39,4

7.6. Liberación controlada

-Preparar una solución madre de vitamina C diluyendo 10 mg de vitamina en 100 ml de PBS 1X.
-Preparar 5 disoluciones a (75 / 50 / 25/ 12,5 / 6,25) mg/l agregando (7,5 / 5 / 2,5 / 0,125 / 0,065) ml de solución madre y diluir hasta 10 ml.
-Medir absorbancia del blanco (PBS 1X) a 265 nm.
-Tomar una alícuota de cada solución y medir absorbancia a 265 nm.
-Montar curva de calibración y anotar valores de “m” y “b”.
-Sumergir 1 disco del hidrogel (6 mm de diámetro x 1 mm de espesor) cargado con extracto de acerola a 1 mg/ml y medir absorbancia a 265 nm en intervalos de tiempo (10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 4 h y 6h). Ejecutar ensayo por triplicado y medir el blanco cada 10 mediciones.
-Convertir valores de absorbancia a concentración con ayuda de la curva de calibración

7.6.1. Datos experimentales para ensayo de liberación controlada

Tabla A2. Valores de absorbancia para la determinación del perfil de liberación para el extracto de acerola a una concentración de 1 mg/ml

Tiempo	**Absorbancia**		
	Muestra 1	**Muestra 2**	**Muestra 3**
0	0	0	0
10	0,009	0,007	0,004
30	0,014	0,011	0,008
60	0,017	0,013	0,012
180	0,020	0,016	0,014
240	0,022	0,017	0,015
300	0,024	0,020	--
360	0,025	0,021	--

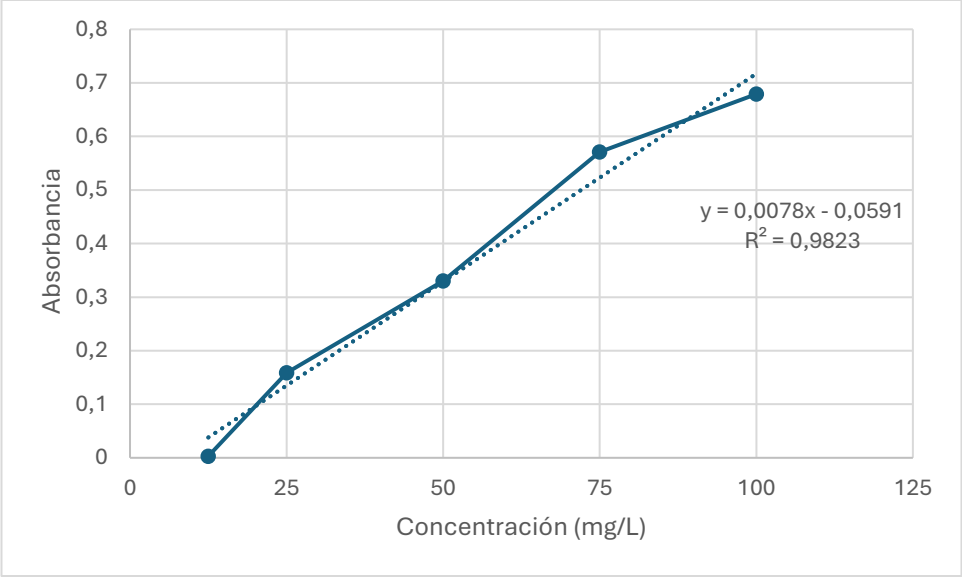


Figura A6. Curva de calibración para determinar la concentración del analito

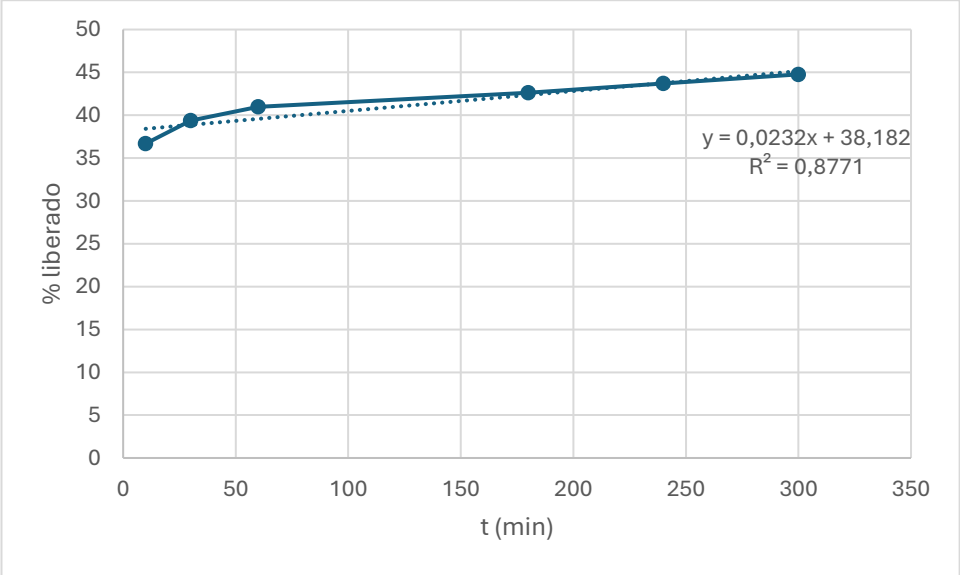


Figura A7. Modelo de ajuste de orden cero

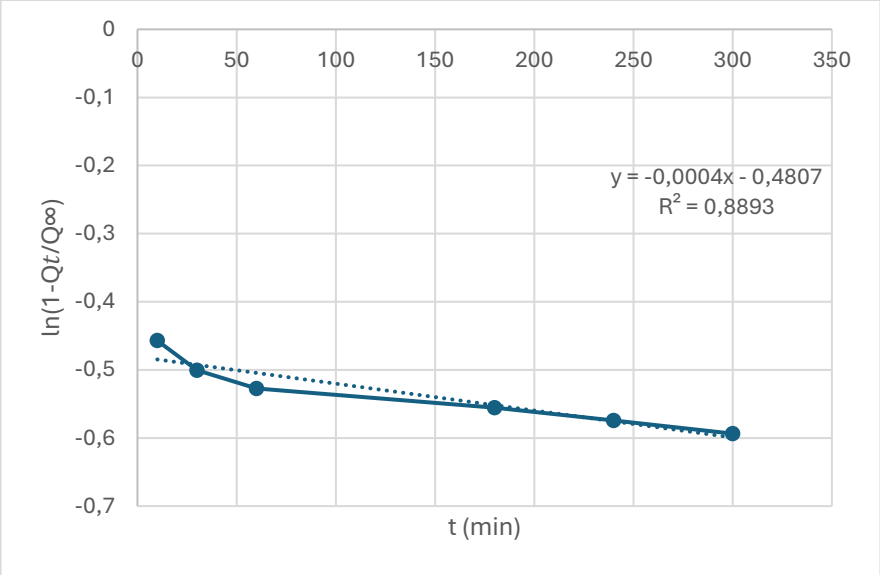


Figura A8. Modelo de ajuste de primer orden

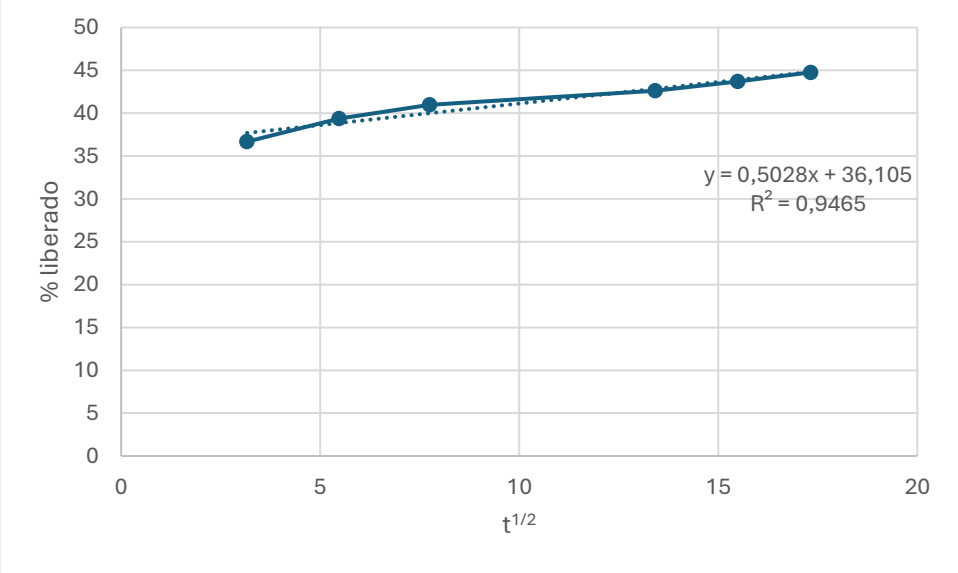


Figura A9. Modelo de ajuste de Higuchi

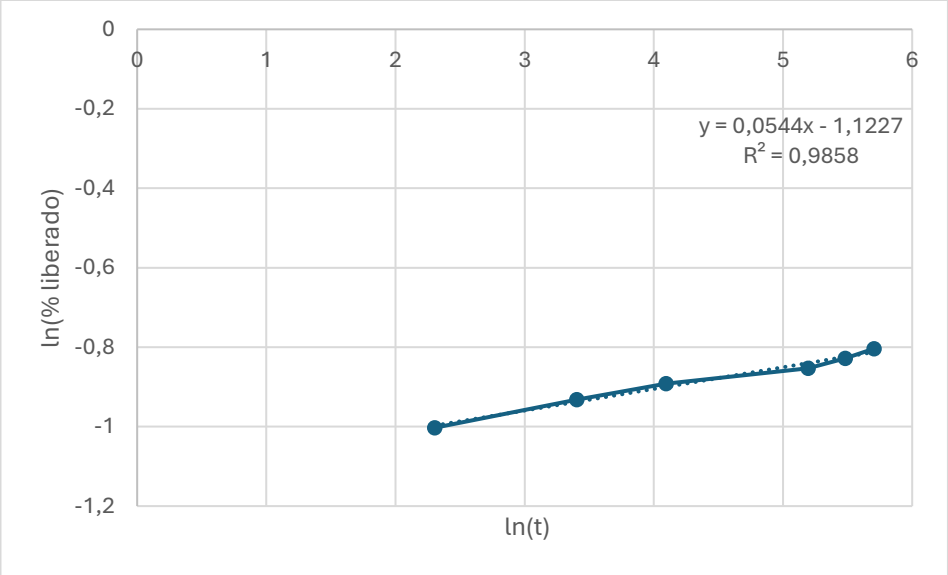


Figura A10. Modelo de ajuste de Korsmeyer-Peppas

7.7. Microscopía electrónica de barrido

I Parte. Preparación de la muestra

-Colocar la muestra previamente **liofilizada** en el portamuestras del equipo

-Recubrir la muestra con una capa delgada de oro utilizando el recubridor por pulverización catódica Denton Vacuum Desk V a 20 mA por 120 s.

-Luego utilizar cinta de carbono de doble cara para garantizar el flujo de corriente entre el recubrimiento y el portamuestras.

-Colocar portamuestras en el porta-portamuestras que activa mecánicamente un sistema de sujeción de 3 puntos.

II Parte. Toma de imágenes

-Insertar la llave correspondiente en el SEM y accionar para dar energía a las computadoras y activar la bomba de vacío.

-Encender las dos computadoras.

-Presionar el botón *Vent* para que la válvula solenoide libere el alto vacío y esperar a que la luz del botón deje de parpadear.

-Abrir el equipo y colocar el portamuestras.

-Cerrar el equipo y accionar el botón *Evac* hasta que deje de parpadear la luz (En esta etapa se vuelve a accionar el alto vacío).

-En el software del equipo accionar la corriente con el botón *HT*.

-Seleccionar los siguientes parámetros:

- Aumentos: 100000
- Corriente: 20 kV
- Tamaño de punto: 40
- Distancia de trabajo: 10 mm

-Capturar imágenes. El brillo, enfoque y contraste se ajustan a conveniencia

7.8. Cálculo de costos

Para la tarifa de luz se utilizó un valor de ₡104,07 por kWh la mano de obra se consideró la jornada laboral diaria de un trabajador en ocupación calificada según lo establecido por el Ministerio de Trabajo y Seguridad Social, que corresponde a ₡13567.

Tabla A6. Costo de materiales asociados al protocolo de metacrilación

Materiales	Cantidad requerida	Costo unitario	Costo total (₡)
Gelatina	5 g	18,56 ₡ / g	92,8
Carbonato de sodio	0,398 g	126,20 ₡ / g	50,22
Bicarbonato de sodio (NaHCO3)	0,735 g	1142,98 ₡ / g	840,09
Anhidrido metacrílico	0,5 mL	114,582 ₡ / ml	57,29
Total	--	--	**1040,41**
Costo por gramo de gelatina recuperada	--	--	**239,17**

Tabla A7. Costo de materiales asociados a la producción de la resina líquida.

Materiales	Cantidad requerida	Costo unitario	Costo total (₡)
Gelatina metacrilada (g)	1	5341,875	5341,875
Riboflavina (g)	0,002	580500	1161
L-arginina (g)	0,1	45,8	4,58
Extracto de acerola (g)	10	74,16	741,6
PBS (ml)	10	12,5	125
Total	--	--	7374,055
Total (₡/mL)	--	--	737,4055

Tabla A8. Costos asociados al consumo energético de los equipos.

Equipo	Potencia (kW)	Horas de uso	Consumo energético (kWh)	Costo (₡)
Plantilla eléctrica	1,5	75	112,5	11707,87
Liofilizador	0,81	48	38,88	4046,24
Consumo total metacrilación	--	--	0	**15754,11**

Impresora 3D Anycubic Photon Mono X	0,12	1	0,12	12,48
Lámpara de curado	0,036	0,5	0,018	1,87
Consumo total impresión 3D	**--**	--	**151,38**	**14,36**