# Fibras core-shell de polímeros biocompatibles cargados con Hidroxiapatita e Ibuprofeno

J. Aragón Fernández<sup>1</sup>, N. Navascues García<sup>1</sup>, S. Irusta Alderete<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Nanociencia de Aragón, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España, {jaragon,sirusta}@unizar.es

#### Resumen

Se obtuvieron fibras núcleo/coraza de polímeros biocompatibles reforzadas con hidroxiapatita y cargadas con ibuprofeno como principio activo modelo, que pueden ser utilizados en aplicaciones biomédicas. Se prepararon 5 tipos de fibras diferentes con diámetros entre 200 nm y 2  $\mu$ m y se caracterizaron por SEM, TEM y AFM encontrándose que las partículas de hidroxiapatita se distribuyeron por toda la fibra produciendo un importante refuerzo mecánico. Se estudió la cinética de liberación del ibuprofeno en PBS encontrándose que la liberación se produce por una combinación de procesos, difusión de Fick, relajación de cadenas poliméricas y posiblemente la poli-dispersión que presentan las nanopartículas de hidroxiapatita y/o la formación de un quelato entre el grupo carboxilo del ibuprofeno y los átomos de calcio de la hidroxiapatita.

# 1. Introducción

El proceso de Electro-hilado (Electrospinning) constituye una vía sencilla y sumamente versátil para la producción de nano-fibras. Estas fibras poseen diámetros que van de varias micras a nanómetros, rangos en los que es posible encontrar características únicas, entre las que se encuentra: un área superficial muy grande en relación al volumen, flexibilidad en la superficie, alta porosidad, poros interconectados y un rendimiento mecánico superior comparado con otras formas ya conocidas del material. Estás características hacen de las nano-fibras, óptimos candidatos para una variedad de aplicaciones biomédicas, entre ellas: ingeniería de tejidos, materiales para cubrir heridas, sustitutos del injerto óseo, implantes dentales, sistemas de liberación de fármacos, injertos vasculares, vasos sanguíneos artificiales y soportes o andamios (scaffolds) para el crecimiento de células o tejidos entre otros [1].

Entre los materiales más utilizados en aplicaciones biomédicas se encuentran los fosfatos de calcio (la hidroxiapatita, que presenta una composición química similar a la fase mineral de tejido óseo, es bioactiva, biocompatible y osteoconductiva), los polímeros naturales como el Colágeno, el Quitosano, etc, y los polímeros sintéticos como la Policaprolactona (PCL), el Ácido Poliláctico (PLA), Alcohol Polivinílico (PVA) y el Acetato de Polivinilo (PVAc) entre otros, que presentan propiedades tales como la biocompatibilidad, la biodegradación y que pueden actuar como sistemas de liberación [2-4]. La incorporación de fármacos en los biomateriales implantables es sumamente importante, ya que en cualquier intervención quirúrgica el riesgo de infección, inflamación y dolor es muy elevado. Por lo que, si el medicamento es incorporado al implante, este

actuará mayoritariamente de forma local sin perjudicar otras zonas del organismo, disminuyendo los efectos secundarios perjudiciales, con lo que se evitan periodos de tiempo prolongados en las terapias post-operatorias [4].

En este trabajo se desarrollan micro y nano-fibras compuestas de PCL, PVA, PVAc y PLA mediante electrospinning cargadas con ibuprofeno, que puedan ser utilizadas como biomateriales de implante óseo, como soportes en ingeniería de tejido y como sistemas de liberación controlada.

# 2. Parte Experimental

#### 2.1. Materiales

Para obtener las fibras se utilizo PLA con un peso molecular de 140000-200000 Da suministrado por (PURAC), PCL con un peso molecular de 80000 Da, PVA con un peso molecular de 146000-186000 Da y PVAc con un peso molecular de 500000 Da, suministrados por Sigma-Aldrich al igual que todos los disolventes orgánicos (diclorometano, dimetilformamida, Cloroformo, Ácido Acético y Acetona), nano-partículas de hidroxiapatita (HAnC), ibuprofeno sódico (IBU) y la disolución buffer de fosfato (PBS).

2.2. Preparación de las fibras mediante Electrospinning



Figura 1. Configuración coaxial de Electropspining

Los polímeros se disolvieron durante toda la noche en los disolventes orgánicos adecuados, luego se adiciono un 20% de HAnC y un 10% de IBU, las fibras preparadas se detallan en la Tabla 1. El proceso de electrospinning se llevo a cabo utilizando un equipo (YFLOW Electrospinner 2,2 D-500) con sistema coaxial como el que se muestra en la Figura 1, los voltajes aplicados en la aguja (electrodo positivo) y el plato estático (electrodo

negativo) oscilaron entre 0 y +30kV y entre 0 y -30kV respectivamente, la distancia entre la aguja y plato fue de 19 cm y las velocidades de flujo de las agujas internas y externas variaron entre 0,2 y 0,8 mL/h.

#### 2.3. Caracterización morfológica

La morfología de las fibras obtenidas se observo mediante microscopia electrónica de barrido (SEM Inspect F50). La micro-estructura de las fibras se analizo mediante microscopia electrónica de trasmisión (TEM, Tecnai 20). Las determinaciones del tamaño de partículas y el diámetro de las fibras se realizo mediante un programa de análisis de imagen software (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Los ensayos mecánicos se realizaron mediante microscopia de fuerza atómica (AFM, Veeco) utilizando puntas NGS30 (NT-MDT), con una fuerza de resorte (k) de 40,49 N/m. La frecuencia de barrido utilizada fue de 0,2 Hz.

Nomenclatura	Aguja		
	Interna	Externa	
PCL-HC-I/PVAc	PCL-HAnC-IBU	PVAc	
PCL-HA-I/PLA	PCL-HAnC-IBU	PLA	
PLA-HC-I/PCL	PLA-HAnC-IBU	PCL	
PLA-HC-I/PVAc	PLA-HAnC-IBU	PVAc	
PCL-HC-I/PVA	PCL-HAnC-IBU	PVA	

Tabla 1. Composición final de las fibras.

## 2.4. Estudio de liberación de ibuprofeno

Los ensayos de liberación se realizaron por quintuplicado. Se cortaron secciones de  $1 \text{ cm}^2$  y se colocaron en un recipiente con tapa que contenía 5mL de una disolución buffer de fosfato durante 8 horas. Todos los recipientes se taparon e introdujeron en una estufa con control de temperatura a  $37 \pm 0,1^{0}$ C durante todo el ensayo. La disolución fue extraída completamente y reemplazada por una cantidad igual de disolución fresca cada una hora durante 8 horas. Para determinar la cantidad de ibuprofeno liberado en cada instante de tiempo, se empleó una curva de calibración de ibuprofeno disuelto en disolución PBS. La determinación se realizó en un espectrofotómetro UV-Visible (*U-Visible Jasco*) a una longitud de onda de 222 nm.

#### 2.5. Ajuste de modelos matemáticos

Para describir el mecanismo mediante el cual tiene lugar la cinética de liberación de ibuprofeno desde las fibras obtenidas, se ajustaron los perfiles de liberación a diferentes modelos matemáticos: Higuchi's  $(M_{\ell}/M_{\infty} = K_H t^{1/2})$  [6], Korsmeyer-Peppas's  $(M_{\ell}/M_{\infty} = K t^n)$  [7], Peppas-Sahlin's  $(M_{\ell}/M_{\infty} = K_1 t^n + K_2 t^{2n}$  [8]. En todas las ecuaciones  $M_t$  y  $M_{\infty}$  son la masa de ibuprofeno liberado en cada instante de tiempo y la masa total, siendo  $K_H$ , K,  $K_1$  y  $K_2$  constantes de velocidad y n el coeficiente de difusión que se relaciona con el mecanismo de liberación [9]. Cuando n=0,5 el estamos en presencia de un mecanismo de liberación que sigue con las leyes de Ficks. Si n=1 el mecanismo de liberación es de orden cero o sea, es controlado por los procesos de hinchamiento y/o relajación de las cadenas poliméricas. Por último si 0,5 < n < 1 el mecanismo deliberación es anómalo y no sigue con las leyes de Ficks.

## 3. Resultados y Discusión

# 3.1. Morfología y Microestructura



Figura 2. Morfología de PLA-HC-I/PCL (a, f), PCL-HC-I/PLA (b), PCL-HC-I/PVAc (c), PLA-HC-I/PVAc (d) y PCL-HC-I/PVA (e).

Se obtuvieron películas delgadas de similar morfología y diferente composición (Figura 2), donde se pudieron apreciar como las fibras forman un enrejado micro-poroso altamente interconectado con diámetros de fibras que oscilan entre 200 nm y 2µm en dependencia de las seleccionadas en el proceso condiciones de electrospinning (Figura 2a-f), se pudo observar que las partículas de nano-hidroxiapatita e ibuprofeno están presentes tanto en la superficie como en el interior de las fibras (Figura 2e, f). Las imágenes obtenidas por TEM (Figura 3), muestran que en el caso de las fibras PCL-HP-I/PCL y PCL-HP-I las partículas inorgánicas se distribuyen tanto en su interior como en su superficie, También se puede observar la estructura núcleo/coraza (core/shell) en todos los casos, ya que al estar compuestas las fibras por polímeros diferentes, estos presentan un contraste diferentes en las imágenes de TEM que permite que se pueda apreciar perfectamente.



Figura 3. Micro-estructura de las fibras obtenidas, PCL-HC-I/PLA (a), PCL-HC-I/PVA (b,c) y PCL-HC-I/PVAc (d). El núcleo esta señalado en amarillo y la coraza en rojo.

#### 3.2. Propiedades mecánicas de las nano-fibras



Figura 4. Topografía y distribución del Módulo de Young obtenidas con AFM de las fibras de PCL.

Para determinar el Módulo de Elasticidad (Módulo de Young) se utilizo como referencia para calibrar el ensayo una película delgada (no-fibrosa) de PCL con un Módulo de Young de 0,5 GPa. En la Figura 4 se puede observar la topografía de las fibras de PCL obtenidas, además se puede apreciar como las fibras presentan un Módulo de Young que oscila entre 2 y 3 GPa (Figura 4b), lo cual evidencia que la fabricación de fibras mediante electrospinning permite mejorar las propiedades mecánicas del PCL. Las zonas con alto Módulo de Young que aparecen en las Figuras 4b y 4c corresponden a un orificio de gran profundidad y el valor es el del soporte.

Por otra parte, cuando adicionamos nano-partículas de hidroxiapatita el Módulo de Young aumenta considerablemente hasta 7 GPa (Figura 5). El nanorelleno refuerza uniformemente todas las fibras debido a que se dispersa homogéneamente por todo el material, proporcionando una mayor resistencia mecánica beneficiosa para aplicaciones en Ingeniería de Tejido, ya que el Módulo de Young es superior al reportado para el hueso trabecular [10].



Figura 5. Topografía y distribución del Módulo de Young obtenidas con AFM de las fibras de PCL-HC-I/PVA.,

#### 3.3. Cinética de liberación de Ibuprofeno

En la Figura 7 se pueden observar los perfiles de liberación de tres de las fibras obtenidas con diferente composición. La mayor parte de la liberación del ibuprofeno se produce durante la primera hora y desde la segunda hasta la octava hora la liberación de ibuprofeno desde las fibras de PCL-HC-I/PVAc no presenta diferencias estadísticamente significativas. Mientras que en el caso de las fibras de PLA-HC-I/PVAc y PCL-HC-I/PVA la liberación de ibuprofeno es sostenida a lo largo de las 8 horas de estudio.



Figura 6.Perfil de liberación de ibuprofeno desde tres fibras tipo core/Shell.

Con el objetivo de analizar la cinética de los perfiles de liberación de ibuprofeno y los mecanismos asociados al proceso de difusión, se ajustaron los tres perfiles de liberación a los modelos matemáticos descritos anteriormente (Tabla 2).

Los perfiles de liberación de las tres muestras estudiadas no presentan un buen ajuste matemático al modelo de liberación planteado por Higuchi, lo que evidencia que el fenómeno mediante el cual ocurre el proceso de difusión no es únicamente una difusión Fickiana [6].

	Korsmeyer y Peppas			
	K	n	1	r
PCL-HP-I/PCL	0,64±1	0,06±1	0,8886	
PCL-HC-I/PVAc	0,22±1	0,07±1	0,9657	
PLA-HC-I/PVAc	0,49±1	0,18±1	0,9940	
PCL-HC-I/PVA	0,32±1	0,11±1	0,9982	
	Peppas y Shalin			
	<b>K</b> <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	n	r
PCL-HP-I/PCL	0,91±2	-0,29±1	0,26±2	0,9787
PCL-HC-I/PVAc	0,32±1	-0,10	0,21±1	0,9895
PLA-HC-I/PVAc	0,57±6	$-0,08\pm6$	0,23±6	0,9934
PCL-HC-I/PVA	0,22±5	$0,1{\pm}1$	$0,08{\pm}1$	0,9979

**Tabla 2.** Parámetros y constantes calculados en el ajuste de los modelos matemáticos que mejor ajustan a los perfiles de liberación obtenidos en cada caso

Por otra parte, los modelos propuestos por Korsmeyer-Peppas y Peppas-Shalin presentan un buen ajuste matemático, que nos permitirá predecir la cantidad de ibuprofeno liberada en cada instante de tiempo en fibras de igual composición y que sean cargadas con un mayor o menor contenido de ibuprofeno. Esto puede resultar muy beneficioso en dependencia de la aplicación de interés. Además se evidencia que la liberación de ibuprofeno ocurre mediante la combinación de un proceso de difusión que cumple la ley de Fick y un proceso de difusión controlado por la relajación de las cadenas poliméricas [9]. Los valores calculados para el coeficiente de difusión toman en todos los casos valores menores de 0,5, esto evidencia que en el sistema está presente algún otro fenómeno que afecta la cantidad de ibuprofeno liberado en cada momento. Las fibras están compuestas por una matriz polimérica cargada con ibuprofeno y nanopartículas de hidroxiapatita, estas nano-partículas presentan una poli-dispersión que puede provocar cambios en la cinética de liberación [9]. Otra posible explicación para los bajos valores de n es que la liberación de ibuprofeno se ve afectada por fenómenos físico-químicos que interfieren con el transporte de ibuprofeno como la formación de complejos de quelato de calcio-ibuprofeno mediante la interacción del grupo carboxilo presente en el ibuprofeno con los iones de calcio de la hidroxiapatita [11,12].

# 4. Conclusiones

Se han sintetizado mediante electrospinning fibras núcleo-coraza combinando los polímeros PCL, PLA, PVA y PVAc. Se ha incorporado exitosamente en estas fibras hidroxiapatita que está homogéneamente distribuída tanto en el interior como en la superficie de las fibras. El agregado de HA aumenta aún más el refuerzo mecánico obtenido mediante el electrospinning. Simultáneamente se ha introducido en las fibras ibuprofeno cuya liberación se estudió, encontrándose que la misma está regida por la difusión de Fick, la relajación de las cadenas poliméricas y otro fenómeno que podría estar relacionado con la presencia de HA. Estos materiales podrían ser utilizados como biomateriales de implante óseo, sistema de liberación controlada de principios activos y como soporte en ingeniería de tejido.

# Agradecimientos

Este trabajo se ha desarrollado gracias a las Ayudas de Movilidad para Latinoamericanos convocadas por la Universidad de Zaragoza y el Banco Santander.

## Referencias

- Teo WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, vol 17, 2006, pp R89-106 (ISSN: 0957-4484).
- [2] Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, vol 49, 2008, pp 5603-21 (ISSN: 0032-3861).
- [3] Chronakis IS. Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process—A review. *Journal of Materials Processing Technology*, vol 167, 2005, pp 283-93 (ISSN: 0924-0136).
- [4] Chiu JB, Luu YK, Fang D, Hsiao BS, Chu B, Hadjiargyrou M. Electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol 1, 2005, pp 115-32 (ISSN: 1550-7033).
- [5] Paz A, Guadarrama D, López M, González JE, Brizuela N, Aragón J. A Comparative study of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by different routes. *Quimica Nova*, vol 35, 2012, pp 1724-7 (ISSN: 0100-4042).
- [6] Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication, Theoretical analysis of rate of release of solid drug dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Science*, vol 52, 1963 pp 1145-9 (ISSN: 0022-3549).
- [7] Korsmeyer RW, Peppas NA. Swelling-Controlled delivery systems for pharmaceutical application: macromolecular and modeling consideration. In: Roseman JT, Mansdorf SZ, editors, Controlled Release Delivery Systems, New York: Marcel Dekker; 1983, p, 77-79.
- [8] Peppas NA, Sahlin JJ. A simple equation for the description of solute release, III, Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutical*, vol 57, 1989 pp 169-72, (ISSN: 0378-5173).
- [9] Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release, II, Fickian and anomalous release from swellable device. *Journal of Control Release*, vol 5, 1987 pp 37-42 (ISSN: 1873-4995).
- [10] Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, vol 24, 2003, pp 2161–75 (ISSN: 1878-5905).
- [11] Ooya T, Eguchi M, Ozaki A,Yui N. Carboxyethylesterpolyrotaxanes as a new calcium chelating polymer: synthesis, calcium binding and mechanism of trypsin inhibition. *International Journal of Pharmaceutical*, vol 242, 2002, pp, 47–54 (ISSN: 0378-5173).
- [12] Stigter M, Bezemer J, de Groot K, Layrolle P. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. *Journal of Control Release*, vol 99, 2004, pp 127–37 (ISSN: 1873-4995).