



RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



UNIVERSIDAD NACIONAL
DE MAR DEL PLATA



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
FACULTAD DE INGENIERÍA**

**“SISTEMAS POLIMÉRICOS BIOCOMPATIBLES PARA
LIBERACIÓN CONTROLADA DE EMBELINA”**

TESIS DOCTORAL

BIOING. PABLO R. CORTEZ TORNELLO

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIA DE MATERIALES

DIRECTOR: DR. GUSTAVO A. ABRAHAM

CO-DIRECTOR: DRA. TERESITA R. CUADRADO

MAR DEL PLATA, FEBRERO DE 2015

*A la memoria de mis abuelos, Tata y
Mamá, siempre presentes en este
camino*

*Nuestra recompensa se encuentra en el
esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo
total es una victoria completa.*

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gustavo A. Abraham, director de esta tesis doctoral, por ser mi guía en este camino y abrirme las puertas al mundo científico, haciendo crecer en mí el amor por la ciencia. Sus sabios consejos, acompañamiento constante y dedicación, sin dudas son responsables del desarrollo y éxito de esta tesis doctoral. Infinitas gracias.

A la Dra. Teresita R. Cuadrado, co-directora de esta tesis doctoral, por creer en mí desde el primer momento, enseñarme la pasión y dedicación por la investigación y la ciencia, el trabajo interdisciplinario, ser guía en mis primeros pasos en la investigación y abrirme las puertas a este fascinante mundo de la ciencia.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, la Universidad Nacional de Mar del Plata y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica, por la financiación del trabajo de investigación. A CONICET, por el otorgamiento de la beca doctoral que permitió llevar a cabo esta tesis.

A los Dres. Gabriela Feresin, Alejandro Tapia y todo el equipo del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de San Juan, por su colaboración fundamental para el desarrollo de esta tesis doctoral, y por creer en mí desde los primeros pasos.

A la Dra. Ângela Morães de la Facultad de Engenharia Química de la Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, por sus enseñanzas y colaboración en esta tesis doctoral.

A los Dres. Alejandro Sosnik, Julieta Imperiale y Katia Seremeta, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por su colaboración y consejos, durante el desarrollo de este trabajo doctoral.

A todo el Equipo de la Div. Polímeros Biomédicos de INTEMA, por su acompañamiento, consejos, enseñanzas y contención durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al personal de las División Ex Polímeros y de INTEMA, por su colaboración, consejos y acompañamiento durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al personal del Laboratorio de Mediciones y Procesamiento de Señales de la Facultad de Ingeniería, UNMDP, por su colaboración en el desarrollo de esta tesis doctoral.

A mis Padres y Familia por ser mi guía, enseñarme los verdaderos valores de la vida, acompañarme y aceptar todas mis decisiones y elecciones, creyendo en mí en todo momento. Infinitas gracias.

A mi familia marplatense del corazón, por su compañía, contención y amor, sin condiciones ni prejuicios.

A mis amigos, esos que sin pedir nada a cambio y sin juzgar, me acompañaron durante todo este tiempo, demostrándome que aún existen valores y cariño verdadero.

A toda la familia CAUCES y PS, por su acompañamiento contención y guía. Por enseñarme que hay valores y responsabilidades con el prójimo y la sociedad, y que somos responsables por el mundo en que vivimos.

A Dios y a la Virgen, por tantos dones y afectos....

“O valor das coisas nao está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

Fernando Pessoa

Índice

Resumen.....	9
Abstract.....	11
Listado de figuras	14
Listado de tablas	18
Capítulo 1	
Introducción.....	20
1. Introducción.....	21
1.1. Biomateriales.....	22
1.2. Ingeniería de tejidos y liberación de agentes terapéuticos.....	24
1.3. Embelina.....	28
1.4. Estrategias para la obtención de estructuras tridimensionales porosas.....	32
1.5. Procesos electrohidrodinámicos.....	37
1.5.1. Electrohilado de soluciones poliméricas.....	38
1.5.1.1. Propiedades intrínsecas de la solución polimérica.....	41
1.5.1.2. Parámetros del proceso de electrohilado.....	43
1.6. Objetivos de la tesis e hipótesis.....	47
1.7. Referencias.....	48
Capítulo 2	
Obtención y caracterización de matrices poliméricas micro/nanofibrosas	53
2.1. Introducción.....	54
2.2. Obtención de matrices poliméricas.....	58
2.2.1. Materiales	58
2.2.2. Preparación de matrices poliméricas fibrosas mediante electrohilado de soluciones.....	59
2.3. Caracterización morfológica.....	60
2.4. Análisis de la microestructura de las matrices poliméricas	61
2.4.1. Análisis microestructural mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	61
2.4.2. Determinación del ángulo de contacto	61
2.5. Determinación de la porosidad de matrices poliméricas micro/nanofibrosas.....	62
2.5.1. Medición gravimétrica (GM).....	62
2.5.2. Método de intrusión espontánea de líquidos (LIM)	63
2.5.3. Análisis de micrografías SEM.....	63
2.5.4. Porosimetría de extrusión de líquidos (LEP)	65
2.5.5. Análisis estadístico	69
2.6. Estudio de la porosidad de matrices poliméricas electrohiladas	70
2.6.1. Preparación de matrices y caracterización morfológica mediante SEM	70
2.6.2. Análisis de la distribución de tamaño de poro mediante LEP	72
2.6.3. Análisis de la porosidad de matrices poliméricas.....	76
2.6.4. Modelado del tamaño de poro de matrices electrohiladas	78

2.7. Conclusiones parciales	82
2.8. Referencias.....	83
Capítulo 3	
Estudio de la dispersión de embelina en matrices poliméricas	86
3.1. Introducción.....	87
3.1.1. Matrices micro/nanofibrasas como sistemas de liberación controlada de agentes terapéuticos	90
3.2. Materiales.....	95
3.3. Métodos.....	96
3.3.1. Preparación de matrices poliméricas fibrosas mediante electrohilado de soluciones.....	96
3.3.1.1. Matrices poliméricas fibrosas	96
3.3.1.2. Matrices poliméricas fibrosas con embelina.....	96
3.3.2. Preparación de filmes mediante colada de soluciones.....	97
3.4. Caracterización fisicoquímica y morfológica.....	98
3.4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	98
3.4.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	98
3.4.3. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	99
3.4.4. Difracción de rayos X (DRX).....	101
3.4.5. Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).....	102
3.5. Análisis de la incorporación de embelina en matrices poliméricas	103
3.5.1. Preparación de matrices poliméricas con embelina y caracterización morfológica.....	103
3.5.2. Análisis de las propiedades térmicas y cristalinidad.....	106
3.5.3. Caracterización de la superficie	110
3.6. Conclusiones parciales	115
3.7. Referencias.....	116
Capítulo 4	
Estudio del proceso de liberación in vitro de embelina incorporada en matrices poliméricas micro/nanofibrasas.....	119
4.1. Introducción.....	120
4.1.1. Sistemas de liberación controlada	122
4.1.1.1. Sistema de liberación controlada por difusión	123
4.1.1.2. Sistema de liberación controlada por activación del solvente	124
4.1.1.3. Sistema de liberación controlada por reacción química o enzimática	126
4.1.1.4. Sistema de liberación controlada por el ambiente fisiológico.....	127
4.1.2. Condiciones sink	128
4.1.3. Liberación inicial rápida	129
4.1.4. Modelos matemáticos de cinética de liberación	131
4.2. Materiales.....	138

4.3. Obtención de matrices poliméricas micro/nanofibrosas con embelina.....	139
4.3.1. Preparación de matrices fibrosas y filmes de PCLE.....	139
4.3.2. Preparación de matrices fibrosas multicapa.....	139
4.3.3. Cuantificación de la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación de embelina.	140
4.3.4. Determinación de la liberación de embelina.....	141
4.4. Análisis del proceso de liberación de embelina en matrices micro/nanofibrosas.....	141
4.4.1. Contenido de embelina, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación	141
4.4.2. Estudio del proceso de liberación de embelina	143
4.4.2.1. Efecto del solvente de electrohilado y del pH del medio de liberación.....	143
4.4.2.1.1. Análisis de la cinética de liberación.....	143
4.4.2.2. Efecto de la concentración de embelina y del pH.....	150
4.4.2.2.1. Análisis de la cinética de liberación	151
4.4.2.3. Efecto de la estructura multicapa y del pH.....	155
4.4.2.3.1. Análisis de la cinética de liberación	157
4.5. Conclusiones parciales	165
4.4. Referencias.....	166

Capítulo 5

Obtención y caracterización de micropartículas poliméricas con embelina y su evaluación como sistema de liberación.....	168
5.1. Introducción.....	169
5.1.1. Preparación de micro/nanopartículas poliméricas.....	169
5.1.2. Micro/nanopartículas poliméricas como sistemas de liberación controlada.....	175
5.1.3. Empleo de la técnica de atomización electrohidrodinámica para la obtención de matrices para ingeniería de tejidos.....	179
5.2. Materiales.....	180
5.3. Métodos.....	181
5.3.1. Preparación de micropartículas mediante emulsión/liofilización	181
5.3.2. Preparación de micropartículas mediante atomización electrohidrodinámica (EHDA).....	182
5.4. Caracterización de micropartículas.....	183
5.4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	183
5.4.2. Determinación del tamaño de partículas y potencial Z.....	183
5.4.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	184
5.4.4. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	184
5.4.5. Difracción de Rayos X (DRX)	184
5.4.6. Cuantificación de la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación de embelina.....	184
5.4.7. Determinación de la liberación de embelina.....	185
5.5. Caracterización fisicoquímica y morfológica de micropartículas	186

5.5.1. Caracterización morfológica de micropartículas	186
5.5.2. Propiedades térmicas y cristalinidad de micropartículas	192
5.5.3. Caracterización de la composición superficial	195
5.5.4. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación	196
5.6. Estudio del proceso de liberación de embelina en micropartículas de PCLE	198
5.6.1. Efecto del pH del medio	198
5.6.2. Efecto del método de obtención.....	201
5.6.4. Análisis de la cinética de liberación.....	203
5.7. Conclusiones parciales	207
5.8. Referencias.....	208
Capítulo 6	
Conclusiones finales y trabajo futuro.....	212
Conclusiones finales	213
Trabajos de investigación futuros.....	215
Capítulo 7	
Producción científica.....	217

Resumen

En los últimos años la ciencia e ingeniería de biomateriales ha realizado importantes avances en el desarrollo de biomateriales poliméricos y compuestos con estructuras y morfologías micro- y/o nanométricas para su empleo como sistemas de liberación controlada y vectorizada de agentes terapéuticos y en la obtención de matrices extracelulares artificiales para ingeniería de tejidos.

Las micro y nanofibras electrohiladas presentan características funcionales de gran atractivo para su uso como vectores para administración de agentes terapéuticos. Su estructura porosa con poros interconectados de alta superficie específica y el pequeño espesor de la matriz producen un aumento de la velocidad de difusión del agente bioactivo mejorando la transferencia de masa y en consecuencia conduciendo a un proceso de liberación más eficiente. Dependiendo de la morfología de las fibras, porosidad y composición de la matriz, es posible diseñar la forma de dosificación del agente terapéutico, de modo tal, que posea una cinética de liberación rápida, retardada o modificada.

En el Capítulo 1 se introduce y define la ingeniería de tejidos y la liberación controlada de drogas, como tecnologías interdisciplinarias, modernas y alternativas emergentes para el tratamiento de numerosas situaciones que requieren regeneración de tejidos y órganos. Además, se describe la embelina, agente terapéutico natural, sus propiedades y aplicaciones.

En el Capítulo 2 se presenta la obtención, caracterización y análisis de una serie de matrices micro y nanofibrosas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) con diámetro medio de fibra comprendido en el rango de 0,4 a 7 μm . La caracterización se centra en la medición del diámetro medio de fibra a partir del análisis de imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM), el diámetro medio de poro y su distribución a partir de mediciones por porosimetría de extrusión de líquidos (LEP), la porosidad de las matrices determinada mediante un conjunto de técnicas que incluyen mediciones gravimétricas, intrusión de líquido, análisis de imágenes SEM, y mediciones por LEP. Los resultados de porosidad se analizan comparativamente, considerando la precisión de cada técnica empleada. Por último, y a fin de comparar los datos empíricos de tamaño de poro obtenidos a partir de LEP, se aplica un modelo teórico

multiplanar para matrices estocásticas fibrosas desarrollado por Eichhorn y Sampson. La porosimetría LEP demostró un alto potencial para el estudio de las características de porosidad de las matrices electrohiladas en comparación con otras técnicas de análisis no instrumentales.

En el Capítulo 3 se preparan matrices electrohiladas y filmes de PCL incorporando distintas cantidades de embelina y utilizando diferentes solventes. Los sistemas se caracterizan empleando una amplia variedad de técnicas experimentales para estudiar la influencia de la embelina en las propiedades fisicoquímicas, térmicas y superficiales. Asimismo, se analiza la calidad de la dispersión de embelina en las matrices poliméricas obtenidas mediante diferentes técnicas. El análisis de la superficie de los sistemas permitió determinar la presencia embelina en la región superficial. La embelina debe encontrarse en forma de agregados amorfos dado que no se observaron evidencias de una fracción cristalina.

En el Capítulo 4 se estudian los procesos de liberación de embelina en medios con diferente pH a partir de sistemas preparados con distintos solventes y contenido de embelina. Se proponen algunas estrategias para modular los perfiles de liberación *in vitro* de embelina y al mismo tiempo disminuir el efecto de liberación inicial rápida en matrices electrohiladas de PCL con embelina. Con este objetivo se preparan distintos sistemas multicapa que actúen como barreras nanofibrosas a los procesos de disolución rápida de embelina superficial. Los resultados evidenciaron que es posible modular el perfil de liberación del sistema dependiendo del número y espesor de capas introducidas en la matriz base que actúa como reservorio de embelina. La cinética de liberación de todos los sistemas matriciales se analiza efectuando el ajuste de las curvas de liberación con los modelos de orden cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas, a partir de los cuales se determinan y analizan los parámetros de ajuste y su relación con los mecanismos de difusión operantes. Por lo anteriormente expuesto, puede concluirse que los sistemas nanofibrosos preparados presentan valores de concentración de embelina en el rango de la ventana terapéutica y por lo tanto poseen una importante potencialidad como sistemas de liberación controlada de embelina.

Finalmente en el capítulo 5 se aborda el estudio de otro tipo de sistemas poliméricos para liberación de embelina. Se describe la preparación de

micropartículas de PCL con embelina mediante la técnica convencional de emulsión/liofilización y la técnica de atomización electrohidrodinámica (EHDA). Esta última es una técnica de vanguardia para la obtención de micro/nanopartículas que no requiere las etapas de emulsión y evaporación de las técnicas clásicas, dado que se secan instantáneamente en el proceso. Se presenta la caracterización fisicoquímica, térmica y morfológica. Se estudia la cinética de liberación de las micropartículas en dos medios de pH diferente, efectuando el ajuste de las curvas de liberación con los modelos de orden cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas, a partir de los cuales se determinan y analizan los parámetros de ajuste y su relación con los mecanismos de difusión y transporte que tienen lugar durante el proceso. Las micropartículas obtenidas por EHDA presentaron perfiles de liberación que combinan una liberación inicial rápida que proporciona una dosis elevada (dosis de ataque) seguida por una etapa de liberación controlada. Esta última está asociada al mayor tamaño y área superficial de partícula y la mayor eficiencia de encapsulación. Estas micropartículas resultan altamente atractivas como vectores de administración de embelina por vía inhalatoria para aplicaciones en terapias pulmonares.

Por último, en el Capítulo 6, se presentan las conclusiones más importantes del presente trabajo y las perspectivas futuras del mismo, tendientes a complementar algunos estudios y ampliar la variedad de sistemas poliméricos con embelina.

Abstract

In the last years, biomaterials science and engineering has demonstrated relevant advances in the development of polymeric and composite biomaterials with structures and morphologies in the micro and nanometric range. These scaffolds were explored as controlled and targeted drug delivery systems and artificial extracellular matrix for tissue engineering applications.

Electrospun micro and nanofibers present functional features very attractive for applications in the field of therapeutic agent administration. The porous structure, with interconnected pores and high specific surface area, as well as low thickness, lead to an increase in diffusion rate of bioactive agents that allow

improving mass transfer and delivery. Depending of fiber morphology, porosity and matrix composition it is possible to design a dosage form for each specific release kinetics: fast, delayed or modified.

In Chapter 1, tissue engineering and controlled drug delivery systems are defined and introduced as modern interdisciplinary technologies and emerging alternatives for numerous situations where tissue and organ regeneration is required.

In Chapter 2, preparation, characterization and analysis of a series of micro/nanofibrous matrices based on poly(ϵ -caprolactone) (PCL) with fiber mean diameter in the range of 0,4 to 7 μm is presented. Characterization is focused on the measurement of fiber mean diameter by electron scanning microscopy (SEM) analysis, pore mean diameter and its distribution by liquid exclusion porosimetry (LEP), porosity as determined by several techniques that include gravimetric measurements, liquid intrusion, SEM image analysis and LEP. Results are comparatively analyzed by considering the accuracy of each technique. Finally, in order to compare the empiric data of pore size obtained by LEP, a theoretical multiplanar model for stochastic fibrous matrices developed by Eichhorn and Sampson was applied. LEP demonstrated a high potential for the study of porosity characteristics of electrospun matrices in comparison to other no instrumental available techniques.

In Chapter 3, PCL electrospun matrices and films were prepared by incorporating different amounts of embelin and using different solvents The resulting systems were characterized by using a wide variety of experimental techniques, in order to study the influence of embelin in physicochemical, thermal and surface properties. Moreover, the quality of embelin dispersion in the polymeric matrix is analyzed by using different techniques. The surface analysis allowed the determination of embelin, which was present with the form of amorphous clusters.

In Chapter 4, embelin release behavior in buffer solutions with different pH of all the systems were studied. Some strategies for modulating the embelin in vitro release profiles and at the same time to decrease the burst effect that occur in electrospun matrices of PCL with embelin, are proposed. To this goal, different multilayer systems are prepared to introduce nanofibrous barriers to the fast dissolution process associated to surface dispersed embelin. The results

indicate that it is possible to modulate the release profiles depending on the number and thickness of each layer added to the matrix base, which acts as a drug reservoir. The release kinetics is analyzed by fitting the release curves with zero-order, Higuchi and Korsmeyer-Peppas models. From this, fitting parameters and its relationship with the operating diffusion mechanisms are analyzed. Based on these studies, it can be concluded that embelin-loaded nanofibrous systems have a huge potential as controlled drug delivery system.

Finally, in Chapter 5, other kind of polymeric system for embelin release is studied. Embelin-loaded PCL microparticles are prepared by means of an emulsion/freeze drying as conventional technique, and electrohydrodynamic atomization (EHDA). EHDA is a cutting-edge technology for fabrication of micro/nanoparticles without using emulsion and evaporation steps. Physicochemical, thermal and morphological characterization is presented. Release kinetics is studied in two different pH. As in the case of electrospun matrices, release curves are fitted with zero-order, Higuchi and Korsmeyer-Peppas, to determine the fitting parameters and its relationship with the transport and diffusion mechanisms that take place during the process. Microparticles obtained by EHDA present release profiles that combine a high initial release (burst effect) useful for early attack treatment, followed by a controlled release stage. This can be due to the higher size, surface area, and encapsulation efficiency of the particles. These microparticles are very attractive as targeted administration of embelin by inhalation therapy for pulmonary diseases.

Last, in Chapter 6, the main conclusions of the thesis as well as the future perspectives of this work are presented.

Listado de figuras

Capítulo 1

- Fig. 1.1.** Especie *Oxalis erythrorhiza*, nombre común “boldo de la Cordillera”
- Fig. 1.2.** Estructura química de embelina (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona)
- Fig. 1.3.** Ejemplos de matrices porosas para aplicaciones en ingeniería de tejidos obtenidas por distintas técnicas, a) mallas de fibras entremezcladas; b) evaporación de solvente y disolución de partículas; c) separación de fases; d) eliminación de porógenos; e) electrohilado; f) separación de fases inducida térmicamente (TIPS); g) autoensamblado inducido por segregación de hielo (ISISA); h) autoensamblado; i) manufactura aditiva: moldeo por deposición de fundido (FDM); j) manufactura aditiva: estereolitografía (SLA); k) manufactura aditiva: Sinterizado selectivo por láser (SLS).
- Fig. 1.4.** Montaje experimental básico para electrohilado de soluciones poliméricas
- Fig. 1.5.** Imagen del equipo de electrohilado empleado para procesos electrohidrodinámicos
- Fig. 1.6.** Tipos de colector utilizados en el proceso de electrohilado; a) colector plano, b) colector rotatorio de disco, c) placas paralelas, y d) colector de punta.

Capítulo 2

- Fig. 2.1.** Estructura química de poli(ϵ -caprolactona), según nomenclatura IUPAC (1,7)-polioxepan-2-ona. De acuerdo a los métodos de síntesis empleados, los extremos de cadena suelen tener grupos hidroxilos
- Fig. 2.2.** Tipos de poros en materiales porosos
- Fig. 2.3.** Cámara de muestra y colocación de la muestra para una determinación de LEP
- Fig. 2.4.** Porosímetro de extrusión de líquidos (LEP Modelo 1100-A-X, Porous Materials, Inc.)
- Fig. 2.5.** Porosímetro de extrusión de líquidos y cámara de extrusión
- Fig. 2.6.** Micrografías SEM de las matrices electrohiladas de PCL (magnificación 1000X)
- Fig. 2.7.** Distribución de diámetro de fibras de las matrices electrohiladas de PCL
- Fig. 2.8.** Curva típica de volumen de poro acumulado en función del diámetro de poro, obtenida por LEP. El tamaño de poro es calculado por el porosímetro registrando el tamaño de poro decreciente, a medida que se incrementa el diferencial de presión
- Fig. 2.9.** Función de distribución de volumen de poro pasante (f_V) como una función del diámetro de poro de las matrices electrohiladas de PCL medida mediante LEP

- Fig. 2.10.** Diámetro de poro d_{LEP} (medido mediante LEP) como una función del diámetro de fibra (determinado mediante análisis de imágenes SEM)
- Fig.2.11.** Porosidad de las matrices electrohiladas de PCL determinadas mediante diferentes técnicas para muestras con diferente diámetro medio de fibra
- Fig.2.12.** Relación entre diámetro de poro y diámetro de fibra, comparando mediciones de LEP (rojo) y resultados del modelo de Sampson (negro)

Capítulo 3

- Fig. 3.1.** Características ideales de los sistemas poliméricos para su empleo como vectores de agentes terapéuticos
- Fig. 3.2.** Formas de incorporación de agentes terapéuticos en micro/nanofibras. a) Incorporación por mezclado en la solución de electrohilado; b) electrohilado coaxial; c) adsorción superficial; d) inmovilización superficial
- Fig. 3.3.** Aplicaciones de los sistemas electrohilados en el campo de la liberación controlada
- Fig. 3.4.** Micrografías SEM de las matrices y filmes de PCL con embelina dispersa, a) PCLfE18A, b) PCLE5A, c) PCLfE5 y d) PCLE5
- Fig. 3.5.** Distribución de frecuencias de fibras electrohiladas en función del diámetro de fibras, a) PCLA, b) PCLE5A, c) PCLE1,5; 3; 5
- Fig. 3.6.** Termogramas de embelina (E), pellet de PCL, PCLE (matrices fibrosas y filmes). El cuadro insertado en la figura muestra la magnificación de las señales correspondientes a la fusión de embelina
- Fig. 3.7.** Termogramas de DSC de PCL, PCLE5, PCLE3, PCLE1,5, PCLfE5, embelina
- Fig. 3.8.** Difractogramas de embelina, PCL, PCLE5A, y PCLE5
- Fig. 3.9.** Espectros de FTIR de embelina, PCLE5A, PCLE5, PCL, y pellet de PCL
- Fig. 3.10.** Espectro XPS de PCL
- Fig. 3.11.** Espectro XPS de PCL, región de C1s
- Fig. 3.12.** Espectro XPS de PCL, región de O1s
- Fig. 3.13.** Relación de señales XPS C1s/O1s de las matrices con respecto a la relación C1s/O1s de PCL

Capítulo 4

- Fig. 4.1.** Disciplinas científicas interrelacionadas con la liberación de agentes terapéuticos
- Fig. 4.2.** Curvas típicas de concentración en plasma empleando, A) dosificación convencional, B) sistema de dosificación lenta, C) sistema ideal de liberación controlada de agentes terapéuticos
- Fig. 4.3.** Difusión de agentes terapéuticos a partir de una matriz polimérica
- Fig. 4.4.** Sistema de liberación de agentes terapéuticos por activación del solvente: sistema controlado por hinchamiento (superior) y sistema reservorio (inferior)

- Fig. 4.5.** Sección transversal de un sistema osmótico para administración oral
- Fig. 4.6.** Sistema de liberación controlada a partir de polímeros biodegradables: a) degradación en masa, b) erosión superficial
- Fig. 4.7.** Sistema de liberación controlada por ambiente fisiológico. Hidrogel con respuesta a glucosa
- Fig. 4.8.** Liberación inicial rápida en un perfil de liberación
- Fig. 4.9.** Perfiles de liberación de embelina en PBS (pH = 7,4) de matrices de PCLE obtenidas con distinta mezcla de solventes: PCLE5A (DCM:MeOH) y PCLE5 (DCM :DMF) ambos 1:1
- Fig. 4.10.** Perfiles de liberación de embelina en PCB (pH = 5) de matrices de PCLE obtenidas con distinta mezcla de solventes: PCLE5A (DCM:MeOH) y PCLE5 (DCM :DMF) ambos 1:1
- Fig. 4.11.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE5A en PBS (pH = 7,4)
- Fig. 4.12.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE5 en PBS (pH = 7,4)
- Fig. 4.13.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE5A en PCB (pH = 5)
- Fig. 4.14.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE5 en PCB (pH = 5)
- Fig. 4.15.** Perfiles de liberación de embelina en PBS (pH = 7,4) de matrices con distinto contenido de embelina: PCLE5, PCLE3 y PCLE1,5.
- Fig. 4.16.** Perfiles de liberación de embelina en PCB (pH = 5) de matrices con distinto contenido de embelina: PCLE5, PCLE3 y PCLE1,5.
- Fig. 4.17.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE3 en PBS (pH = 7,4)
- Fig. 4.18.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE1,5 en PBS (pH = 7,4)
- Fig. 4.19.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE3 en PCB (pH = 5)
- Fig. 4.20.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE1,5 en PCB (pH = 5)
- Fig. 4.21.** Perfiles de liberación de embelina en PBS (pH = 7,4) de matrices de PCLE3, bicapa10, bicapa60, tricapa10 y tricapa60
- Fig. 4.22.** Perfiles de liberación de embelina en PBS (pH = 7,4) de matrices de PCLE3, bicapa10, bicapa60, tricapa10 y tricapa60, mostrando la zona de las primeras 14 h de liberación.
- Fig. 4.23.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz bicapa10 en PBS (pH = 7,4)
- Fig. 4.24.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz bicapa60 en PBS (pH = 7,4)
- Fig. 4.25.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz tricapa10 en PBS (pH = 7,4)
- Fig. 4.26.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz tricapa60 en PBS (pH = 7,4)
- Fig. 4.27.** Perfiles de liberación de embelina en PCB (pH = 5) de matrices de PCLE3, bicapa10, bicapa60, tricapa10 y tricapa60

- Fig. 4.28.** Perfiles de liberación de embelina en PCB (pH = 5) de matrices de PCLE3, bicapa10, bicapa60, tricapa10 y tricapa60, mostrando la zona de las primeras 14 h de liberación.
- Fig. 4.29.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz bicapa10 en PCB (pH = 5)
- Fig. 4.30.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz bicapa60 en PCB (pH = 5)
- Fig. 4.31.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz tricapa10 en PCB (pH = 5)
- Fig. 4.32.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz tricapa60 en PCB (pH = 5)

Capítulo 5

- Fig. 5.1.** Clasificación de partículas poliméricas y su relación con el agente terapéutico
- Fig. 5.2.** Diferentes métodos de incorporación de agentes bioactivos en partículas poliméricas preparadas mediante EHDA monoaxial (nanoprecipitación, emulsión y dispersión sólida), y EHDA coaxial.
- Fig. 5.3.** Esquema de obtención de partículas mediante el método emulsión/liofilización
- Fig. 5.4.** Micrografías SEM (1500X) de micropartículas de PCL obtenidas con $v = 11200$ rpm: A) $\Phi = 10$ ml.h⁻¹, B) $\Phi = 15$ ml.h⁻¹, C) $\Phi = 20$ ml.h⁻¹; micropartículas obtenidas con $v = 15600$ rpm: D) $\Phi = 10$ ml.h⁻¹, E) $\Phi = 15$ ml.h⁻¹, F) $\Phi = 15$ ml.h⁻¹.
- Fig. 5.5.** Micrografías SEM (1500X) de micropartículas de PCL obtenidas con velocidad de homogenización $v = 20000$ rpm: A) $\Phi = 5$ ml.h⁻¹, B) $\Phi = 10$ ml.h⁻¹; micropartículas obtenidas con $v = 24000$ rpm: C) $\Phi = 5$ ml.h⁻¹, D) $\Phi = 10$ ml.h⁻¹; partículas con incorporación de embelina y $v = 24000$ rpm: E) $\Phi = 5$ ml.h⁻¹, F) $\Phi = 10$ ml.h⁻¹.
- Fig. 5.6.** Micrografías SEM de micropartículas de PCL obtenidas con $\Phi = 10$ ml.h⁻¹ y $v = 24000$ rpm: A) PVA 2 % p/v; B) Tween 80 0,2 % p/v; C) PVA 1 % p/v; D) Tween 80 0,1 % p/v.
- Fig. 5.7.** Micrografías SEM de micropartículas de PCL: A) PCL_{sp} (150X); B) PCL_{sp} (1000X); C) PCLE_{sp} (150X); D) PCLE_{sp} (1500X).
- Fig. 5.8.** Termogramas de DSC correspondientes a embelina, PCL y micropartículas de PCL_{em}, PCL_{sp}, PCLE_{em} y PCLE_{sp}.
- Fig. 5.9.** Difractogramas de rayos X de embelina, PCL_{sp}, PCL_{em}, PCLE_{sp} y PCLE_{em}
- Fig. 5.10.** Espectros ATR-FTIR de embelina, PCL y micropartículas PCL_{sp}, PCL_{em}, PCLE_{em} y PCLE_{sp}.
- Fig. 5.11.** Perfiles de liberación de embelina de micropartículas PCLE_{em} y PCLE_{sp} en PBS y PCB.
- Fig. 5.12.** Perfiles de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{em} y PCLE_{sp} en PBS (pH = 7,4)
- Fig. 5.13.** Perfiles de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{em} y PCLE_{sp} en PCB (pH = 5)
- Fig. 5.14.** Perfiles de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{sp} en PBS y PCB

- Fig. 5.15.** Perfiles de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{em} en PBS y PCB
- Fig. 5.16.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{sp} en PBS (pH = 7,4)
- Fig. 5.17.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{sp} en PCB (pH = 5)
- Fig. 5.18.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{em} en PBS (pH = 7,4)
- Fig. 5.19.** Ajuste de la curva de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{sp} en PCB (pH = 5)

Listado de tablas

Capítulo 1

- Tabla 1.1:** Técnicas disponibles para la preparación de matrices tridimensionales porosas acelulares

Capítulo 2

- Tabla 2.1.** Condiciones experimentales usadas para obtener membranas electrohiladas de PCL (T : tensión aplicada, Φ : velocidad de infusión, d : distancia boquilla-colector)
- Tabla 2.2.** Características de matrices electrohiladas de PCL

Capítulo 3

- Tabla 3.1.** Condiciones de procesamiento de matrices fibrosas de PCL
- Tabla 3.2.** Filmes obtenidos mediante colada de soluciones
- Tabla 3.3.** Diámetro medio de fibra (D_m) de matrices electrohiladas
- Tabla 3.4.** Propiedades térmicas de embelina, matrices fibrosas y filmes. ΔH_m , calor de fusión de PCL; ΔH_{mE} , calor de fusión de embelina; T_m , temperatura de fusión; X_{cPCL} , grado de cristalinidad de PCL; X_{cE} , grado de cristalinidad de embelina
- Tabla 3.5.** Energía de enlace de las distintas especies de C1s y O1s de las muestras de PCL y PCLE
- Tabla 3.6.** Relaciones de área superficial para muestras de PCL y PCLE

Capítulo 4

- Tabla 4.1.** Mecanismos de liberación difusional para sistemas no hinchables de diferente geometría
- Tabla 4.2.** Características de las matrices multicapa preparadas
- Tabla 4.3.** Contenido de embelina incorporada en sistemas de PCLE por unidad de masa, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

- Tabla 4.4:** Resultados del ajuste de las curvas de liberación de matrices de PCLE5A y PCLE5 en PBS (pH = 7.4) y PCB (pH = 5)
- Tabla 4.5.** Resultados del ajuste de las curvas de liberación de matrices de PCLE en PBS (pH = 7,4) y en PCB (pH = 5)
- Tabla 4.6.** Resultados del ajuste de las curvas de liberación de matrices de PCLE bicapa y tricapa en PBS (pH = 7,4)
- Tabla 4.7.** Resultados del ajuste de las curvas de liberación de matrices de PCLE bicapa y tricapa en PCB (pH = 5)

Capítulo 5

- Tabla 5.1.** Diámetro medio, potencial Z e índice de polidispersidad de micropartículas.
- Tabla 5.2.** Propiedades térmicas de embelina, PCL, PCLE_{em} y PCLE_{sp}
- Tabla 5.3.** Contenido de embelina incorporada en micropartículas de PCLE, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación
- Tabla 5.4.** Resultados del ajuste de las curvas de liberación de micropartículas de PCLE_{em} y PCLE_{sp} en PBS (pH = 7,4)
- Tabla 5.5.** Resultados del ajuste de las curvas de liberación de micropartículas de PCLE_{em} y PCLE_{sp} en PCB (pH = 5)

Capítulo 1

Introducción

1. Introducción

Las aplicaciones potenciales de estructuras poliméricas porosas, micro y nanofibras en el área de ciencia y tecnología de biomateriales, nanomedicina y medicina regenerativa son numerosas [1, 2, 3, 4]. El diseño de estructuras porosas que actúen como matriz extracelular temporaria para ingeniería de tejidos y liberación controlada de agentes terapéuticos requiere de un cuidadoso control de las etapas de procesamiento de biomateriales [5, 6, 7]. Por lo tanto, la obtención de estructuras poliméricas o compuestas con morfología controlada (contenido y distribución de micro y nanoporosidad, diámetro de fibras y distribución), funcionalidad superficial, contenido, naturaleza y dispersión de agentes terapéuticos, constituyen aspectos importantes que actualmente se encuentran en discusión en la comunidad científica.

Existe una amplia variedad de técnicas experimentales de procesamiento de matrices poliméricas y compuestas para la obtención de matrices porosas [3]. Cada una de ellas posee ventajas y desventajas propias de la etapa de fabricación que afectan el comportamiento celular: presencia de solventes residuales, obstáculos para la infiltración celular, falta de uniformidad y homogeneidad, inadecuada resistencia mecánica, baja reproducibilidad de los sistemas, necesidad del control de parámetros de procesamiento, entre otros importantes aspectos.

Entre las tecnologías de nanofabricación existentes actualmente, el proceso de electrohilado ha adquirido en los últimos años una notable importancia para el procesamiento de soluciones poliméricas (o fundidos) para obtener, con un costo relativamente bajo, matrices micro/nanofibras de una amplia diversidad de formulaciones (incluyendo sistemas nanocompuestos) [7, 8, 9].

Las micro y nanopartículas de poliésteres biodegradables son tema de gran interés desde los últimos 10 años en diversos campos de estudio. En el ámbito farmacéutico resultan muy atractivas, debido a su capacidad para la incorporación y administración de agentes bioactivos [10, 11], facilitando el transporte de los fármacos hacia una zona específica deseada del organismo

[12], permitiendo aumentar su tiempo de residencia a partir de una mayor estabilidad en circulación y evitando su pronta degradación química a causa de agentes externos [13, 14].

En el campo de la liberación de agentes terapéuticos (drogas, fármacos, biomoléculas) existe un interés cada vez mayor en el control de la biodistribución y aumento de la biodisponibilidad de los agentes terapéuticos, en particular de aquellos que son insolubles o pobremente solubles en agua, los cuales poseen probada actividad farmacológica para el tratamiento de diversas afecciones [15]. Entre las estrategias para mejorar la dosificación y accesibilidad al medio biológico de estos agentes, se encuentra el diseño de formulaciones poliméricas con capacidad de incorporar diferentes contenidos de agentes terapéuticos homogéneamente dispersos. Las técnicas de preparación de matrices micro/nanofibrosas de interés en ingeniería de tejidos permiten también la dispersión de estos agentes. Además, este tipo de matrices posee una elevada relación área superficial/volumen e interconectividad de poros, lo cual contribuye a aumentar la exposición al medio biológico de mayor cantidad del agente disperso [8].

Por otra parte, el estudio de la cinética de liberación de agentes terapéuticos pobremente solubles en agua tal como embelina, a partir de sistemas con diferente morfología resulta de interés, dado que no se encuentra reportado en la literatura. Las diferentes morfologías de los sistemas permiten modificar los parámetros correspondientes a la cinética de liberación de los agentes terapéuticos, permitiendo obtener diferentes velocidades y perfiles de liberación.

1.1. Biomateriales

La Sociedad Europea de Biomateriales planteó en 1987 un debate para consensuar una definición de biomaterial que reuniera la aceptación de la comunidad científica internacional. Se determinó entonces que un biomaterial es *un material no vivo usado en un dispositivo médico, destinado a interactuar con el sistema biológico* [16]. Esta definición se modificó en 1992, eliminando la referencia a la naturaleza no viviente del material [17]. Posteriormente en 1999 se definió como biomaterial, al *material destinado a*

interaccionar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo [18]. De esta manera, el concepto de biomaterial estaba asociado solamente al ámbito de la salud humana y a la interacción con los tejidos o componentes tisulares.

La evolución de la ciencia de materiales y las tecnologías relacionadas con la salud tornaron pronto obsoleta esta definición. Las situaciones en las que los biomateriales se usan actualmente son muy diferentes de las situaciones encontradas más de una década atrás. Aunque los dispositivos médicos implantables son aun inmensamente importantes y permiten mejorar la calidad de vida de un muchos seres humanos, las tecnologías médicas emergentes comprenden una variedad de sistemas de liberación de drogas y agentes terapéuticos, ingeniería de tejidos y terapias celulares, diseño de órganos y patrones celulares, nanotecnología basada en sistemas de imágenes y diagnóstico, y dispositivos microelectrónicos. Estas tecnologías aún abarcan el empleo de materiales metálicos, cerámicos, polímeros sintéticos y naturales, pero también sistemas autoensamblados, nanopartículas, nanofibras, nanotubos de carbono, dendrímeros, vectores no virales y marcadores cuánticos. La función de un biomaterial debe ser la de dirigir el curso de un tratamiento médico, sea de diagnóstico o terapia, y debe hacerlo controlando específicamente las interacciones con los componentes biológicos del paciente a ser tratado.

Teniendo en cuenta éstas y otras consideraciones, el concepto de biomaterial ha sido hace pocos años redefinido como *una sustancia diseñada para tomar una forma en la que, sola o como parte de un sistema complejo, se emplea para dirigir, mediante el control de las interacciones con los componentes de sistemas vivos, el curso de un procedimiento terapéutico o de diagnóstico, en medicina humana o veterinaria* [19]. Esta nueva visión del concepto de biomaterial es radicalmente diferente a las propuestas anteriormente. Las muchas sustancias que tradicionalmente no eran pensadas como biomateriales (tejidos ingenierilmente diseñados, células, órganos y virus) deben ahora ser consideradas como tales, dado que sus prestaciones están directamente controladas por las interacciones con los tejidos y los componentes tisulares.

1.2. Ingeniería de tejidos y liberación de agentes terapéuticos

La ingeniería de tejidos (*tissue engineering*) ha surgido en la última década del siglo pasado como una aproximación alternativa para sobrellevar las limitaciones de las terapias tradicionales para la regeneración tisular [20]. Si bien la ciencia e ingeniería de biomateriales ha introducido notables mejoras en el campo de la medicina de sustitución y enormes beneficios para los pacientes, la recuperación funcional resulta incompleta y cada sistema lleva asociado una vida útil limitada. Esta limitación se presenta como uno de los principales problemas mundiales en el sistema de salud. La expectativa de vida se cuadruplicó en los últimos tres siglos y como consecuencia han surgido numerosos incidentes que las terapias actuales no pueden resolver. El problema de la falla de órganos o el reemplazo de tejidos tiende a agravarse anualmente debido a la baja disponibilidad de los mismos y a la dificultad del control de los fenómenos de rechazo. En este contexto, resulta necesario generar conocimiento básico y aplicado, y desarrollar tecnologías y metodologías para sobrellevar la demanda cada vez más imperiosa de tejidos biológicos tales como huesos, cartílagos, articulaciones, nervios, piel, ligamentos, tendones, córneas, órganos bioartificiales (hígado, páncreas), etc. Los importantes avances en el campo de la biología molecular sobre el conocimiento de los mecanismos de regeneración, los nuevos logros de la biotecnología para el cultivo de tejidos a gran escala, y la producción de factores de crecimiento constituyen hoy en día la fuerza impulsora para la promoción y desarrollo de la ingeniería de tejidos como un campo multi- e interdisciplinario [21, 22, 23, 24]. En este sentido, la ingeniería de tejidos se define como, *la aplicación de principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que reemplacen, regeneren, restauren o mejoren diversos tejidos funcionales.*

Los conceptos de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa aparecen numerosas veces en la literatura como sinónimos, compartiendo alcances y objetivos. Sin embargo, recientemente se propuso una definición de medicina regenerativa con objetivos propios y claramente determinados, en donde la ingeniería de tejidos se enmarca como uno de sus principales componentes,

junto con la ciencia de materiales, la biología molecular y de células madre, y la genética [25].

Las estrategias de la ingeniería de tejidos generalmente se dividen en dos categorías [26]: el uso de matrices acelulares, que dependen de la habilidad natural del cuerpo para regenerar el nuevo tejido, y el uso de matrices con células. Las matrices acelulares pueden prepararse empleando andamiajes artificiales o mediante la remoción de componentes celulares de tejidos para producir matrices ricas en colágeno. Las células también pueden emplearse con fines terapéuticos y el tejido autólogo (tejido del propio paciente) es la principal fuente celular y la preferida, aunque en algunos casos se recurre a tejido alogénico (tejido de un donante vivo o fallecido) o heterólogo (tejido de un animal). Existen también tecnologías entre las que se incluyen células madre (de origen embrionario humano, fetal o adulto) [27], la terapia de genes, la clonación terapéutica y la extracción de tejidos y órganos de animales transgénicos [28]. Sin embargo, la clonación terapéutica y la terapia génica involucran diversos aspectos técnicos, económicos, políticos, religiosos y éticos que están en discusión y que deben resolverse antes de que estén disponibles como metodologías maduras para aplicaciones clínicas.

En el caso de emplear células se requiere [29]:

- a) apropiada selección, aislamiento y cultivo de las células primarias (induciendo su diferenciación en fenotipos específicos);
- b) expansión mediante cultivo celular (condiciones estáticas, cultivo en biorreactores específicamente diseñados, o sin cultivo previo e implante directo por inyección de células con o sin un portador inyectable, como por ejemplo un hidrogel);
- c) diseño de una matriz soporte adecuada para la fijación de las células, incluyendo la selección de los materiales apropiados y las metodologías de procesamiento;
- d) uso de modelos animales adecuados que permitan probar *in vivo*, luego de los análisis *in vitro* y antes de los ensayos clínicos, la eficacia de las diferentes aproximaciones seguidas minimizando los ensayos con animales.

En el medio biológico las células constantemente reciben estímulos mecánicos, eléctricos, químicos y estructurales que modulan el comportamiento celular para crecer y formar tejidos funcionales u órganos. Si estas señales externas no se reciben o no procesan adecuadamente, las células no se diferencian, se desorganizan y eventualmente mueren. En la mayoría de los tipos celulares encontrados en los mamíferos la adhesión celular a un sustrato es fundamental para su supervivencia. El estímulo estructural involucra la interacción de las células con su matriz extracelular. Esta comunicación, resulta esencial para la actividad celular normal e impacta directa e indirectamente en la función y forma celular. Los estímulos están mediados por factores de crecimiento, moléculas proteicas que cumplen una acción regulatoria específica en el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de los tejidos.

El empleo de biomateriales juega un rol temporario pero crucial en el diseño ingenieril de tejidos u órganos y, desde los últimos años, se perfila como una estrategia activa que muestra constantes avances en los campos de síntesis, caracterización, propiedades, procesamiento y aplicaciones.

Desde tiempos remotos, la administración de medicamentos siempre ha necesitado de una elaboración más o menos compleja, que permitiera su efectividad en el medio biológico. Incluso con el avance que supuso la obtención de las sustancias medicamentosas químicamente puras, iniciada en el siglo XIX, era necesario dotar a dichas sustancias de una forma farmacéutica que permitiera su administración en una cantidad conocida y controlada (dosis terapéutica), por la vía más adecuada, de manera estable, segura y eficaz [30, 31]. De esta forma, la investigación galénica dio lugar a nuevas formas farmacéuticas que aseguraran dichas condiciones: la cápsula blanda de gelatina atribuida a Mothes en 1833, la cápsula dura de gelatina atribuida a Lehuby en 1846, el comprimido a finales del siglo XIX, etc [31, 32]. A mediados del siglo XX, se comenzaron a plantear nuevas formas farmacéuticas en función de los nuevos conocimientos que generó el estudio de la farmacocinética de agentes terapéuticos con actividades biológicas. A partir de entonces, un agente terapéutico ya no se caracteriza únicamente por su acción sobre el organismo, es decir, por su farmacodinámica, sino también por el efecto que, a través de procesos farmacocinéticos de absorción,

distribución, metabolismo y excreción, ejerce sobre él el propio organismo [32, 33].

En 1971 Yolles *et al.* discutieron sobre el diseño de dispositivos poliméricos para la administración de fármacos y una patente fue presentada por Boswell y Scribner, respecto del uso de poli(ácido láctico) en sistemas para liberación controlada de agentes terapéuticos [34, 35]. Sin embargo, dos artículos ampliamente citados, publicados por Yolles *et al.* en 1973, son considerados a menudo como el punto de partida del desarrollo de sistemas poliméricos para liberación controlada de agentes terapéuticos [36, 37, 38]. Desde entonces, se han desarrollado nuevas formas farmacéuticas cuyos objetivos se han visto ampliados considerablemente, pudiendo señalarse como los más importantes actualmente los siguientes [39]:

- a) administración por la vía más adecuada y en la dosis exacta;
- b) asegurar la estabilidad del sistema de administración durante un tiempo perfectamente estudiado y establecido;
- c) posibilitar una administración eficiente y adecuada a los requerimientos de cada paciente;
- d) posibilitar la administración segura de agentes terapéuticos empleando dosis reducidas, asegurando una homogeneidad de dosis;
- e) proteger el agente terapéutico de los agentes externos, tanto medio ambientales (oxígeno, humedad, etc), como fisiológicos (jugos gástricos, pH, etc);
- f) controlar la liberación y absorción del agente terapéutico;
- g) dirigir selectivamente el agente a determinados órganos o tejidos;
- h) optimizar acciones farmacológicas, reduciendo efectos colaterales.

De este modo, la investigación y desarrollo de sistemas para liberación controlada de agentes terapéuticos, posibilita la obtención de nuevas formas farmacéuticas adecuadas al paciente y patología a tratar, considerando la mejor forma de administración y actuación del agente, que dé lugar a la óptima eficacia y seguridad del agente terapéutico.

1.3. Embelina

El género *Embelia* es un grupo de arbustos pertenecientes a la familia de especies Myrsinaceae [40, 41] y Oxalidaceae [42], más comúnmente conocido como *vidanga* en medicina ayurvédica. A partir de estos arbustos se extrae, como el principal metabolito secundario, una benzoquinona denominada embelina (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona). Durante muchos años esta droga indígena ha sido recomendada para una serie de enfermedades, con uso registrado en textos históricos, incluyendo el Charaka Samhita en 1949, Sushruta Samhita en 1942 y Ashtanga Hridaya en 1950. La embelina se halla en concentraciones de 2 a 3 % en los frutos de los arbustos *Embelia ribes*, *E. robusta* [43], *Ardisia* spp [44] y en *Rapanea* spp (Mirsináceas). *Embelia ribes* (*E. gladiifera*), *Embelia tsjeriam*-Cottam (*E. robusta*, Roxb), es un arbusto distribuido a lo largo de la costa de Malabar de Sri Lanka, y se extiende a través de Sylhet, Singapur y China, así como también en Assam de Cochin y las zonas montañosas de Maharashtra y Konkan en la India [45]. En Argentina, el arbusto *Oxalis erythrorhiza* Gill. (Oxalidaceae) llamada comúnmente “*boldo de la cordillera*”, se encuentra a una altitud entre los 4000-4500 m en la localidad de Bauchaceta, departamento de Iglesia de la provincia de San Juan [42]. En la Fig. 1.1 se observa esta especie andina en cojín *Oxalis erythrorhiza* Gillies ex Hooker et Arnott (Oxalidaceae).

La embelina se incluyó en el British Pharmaceutical Codex en 1934, seguido por el indio Pharmaceutical Codex en 1953, y finalmente se incluyó como una medicina oficial en 1966 en la Farmacopea de la India [46].

Los frutos color naranja brillante, ricos en embelina, se conocen dentro de la etnomedicina y su acción farmacológica se atribuye a la presencia de este agente. Estos frutos se recomiendan por sus propiedades como, astringentes, amargos, picantes, expectorantes, depurativos, digestivos y antibacterianos, diuréticos, anticonceptivos, rejuvenecedores, y estimulantes. Se consideran beneficiosos en enfermedades crónicas de la piel, así como trastornos respiratorios, helmintiasis y trastornos gastrointestinales. También se cree que promueven funciones inmunológicas, mejoran la circulación sanguínea y poseen efectos anti-envejecimiento [47, 48].



Fig. 1.1. Especie *Oxalis erythrorhiza*, nombre común “boldo de la Cordillera”.

La embelina se encuentra en hongos y plantas superiores, es de color amarillo anaranjado y cristaliza en agujas amarillo de oro. Su punto de fusión es 142 - 143 °C, es pobremente soluble en agua (0,13 mg.ml⁻¹) pero soluble en solventes tales como diclorometano (DCM), metanol (MeOH), éter de petróleo, cloroformo (CLF), etc. Presenta diversas actividades biológicas relevantes reportadas tales como, efecto quimiopreventivo en N-nitrosodietilamina/fenobarbital en casos de hepatocarcinogénesis inducida en ratas Wistar [49], efecto de antifertilidad [50], actividad citotóxica in vitro en líneas celulares B16 y XC [51], actividad anticonvulsivante [52], antidiabética [53], y antimicrobiana [42].

La Fig. 1.2 muestra la estructura química de la embelina (CAS N° 550-24-3), de fórmula empírica C₁₇H₂₆O₄ y peso molecular 294,39 g.mol⁻¹.

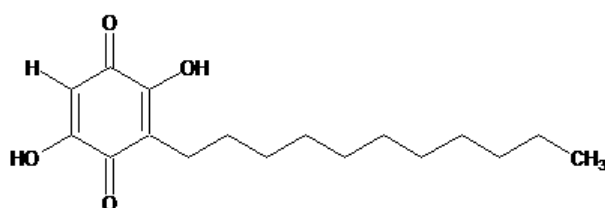


Fig. 1.2. Estructura química de embelina (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona)

Existe abundante bibliografía respecto de embelina y sus propiedades biológicas y aplicaciones en el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo, sólo existen algunos trabajos publicados relacionados con su incorporación en sistemas de administración eficiente, y escasa información de su solubilidad en diferentes medios. Patel *et al.* estudiaron una formulación de comprimidos de embelina que contienen diferentes diluyentes, empleando granulación húmeda y técnicas de compresión directa [54]. Se analizó el efecto de diluyentes como la lactosa, celulosa microcristalina, y la combinación de ambas, a fin de mejorar el flujo y compresibilidad; y se emplearon diferentes aglutinantes como pastas de almidón y polivinilpirrolidona (PVP) alcohólica, para optimizar la resistencia a la trituración de la formulación. Los resultados indicaron que la formulación óptima para la preparación de las tabletas fue empleando 5 % PVP y una combinación de celulosa y lactosa del 10 %. Los ensayos de solubilidad en medios con diferente pH revelaron que la embelina solubiliza de manera óptima ($320 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en medios alcalinos ($\text{pH} = 8,0$), mientras que los valores de solubilidad disminuyen apreciablemente conforme lo hace el pH del medio. Por otro lado, se indicó que la solubilidad de embelina aumenta al incorporar un porcentaje del 5 a 10 % v/v de etanol en los medios empleados, aunque no es posible trasladar este efecto al medio biológico [54].

Kumara Swamy *et al.* estudiaron el efecto de diferentes formulaciones conteniendo embelina, para aplicaciones en cicatrización de heridas [43]. Las formulaciones para administración tópica se prepararon a partir de extractos de etanol con embelina empleando además alginato de sodio, y mediante embelina en polvo con alginato de sodio; formando geles de 0,2 % p/p. Mientras que la formulación para administración oral se obtuvo a partir de una suspensión de etanol ($30 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) con embelina ($4 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), en goma de tragacanto al 1 % p/v. Los resultados indicaron una actividad de cicatrización significativa en todos los casos, respecto del control, mientras que el tiempo requerido para la epitelización completa fue menor a partir del uso de las formulaciones tópicas de embelina con alginato de sodio [43].

Danquah *et al.* estudiaron el efecto de embelina en la proliferación de células de cáncer de próstata a partir de micelas de un copolímero de poli(etilenglicol)-poli(ácido láctico) (PEG-PLA) [55]. Los resultados mostraron

que la embelina activa la caspasa 3 y 9 en las células de cáncer de próstata LNCaP y C4-2, por disminución de la expresión de la proteína XIAP, lo que evita la proliferación de las células tumorales. Por lo que el tratamiento combinado de micelas con bicalutamida (agente terapéutico anticancerígeno) y embelina, resulta una estrategia eficaz para el tratamiento de cáncer de próstata [55].

Por otro lado, Arumugam *et al.* prepararon nanopartículas por emulsión mediante entrecruzamiento de quitosano con embelina, empleando glutaraldehído como agente reticulante [56]. La caracterización fisicoquímica y morfológica realizada resultó insuficiente para comprender efectos de solubilidad e interacción del agente con el polímero natural, presentando una capacidad de carga de embelina de 91,5 % y una eficiencia de encapsulación del 92 %, determinadas por métodos que no contemplan las posibles pérdidas del polímero durante el proceso de preparación de las partículas. El hinchamiento de las partículas en medios con diferente pH (1,2 y 7,4) mostró que las nanopartículas sin embelina, presentaron un aumento de volumen 5 veces mayor que las nanopartículas con agente incorporado. Los resultados de liberación de embelina en los medios mencionados presentan escasa información, asegurando una liberación rápida en apenas 6 h.

Gadhve *et al.* prepararon cristales esféricos de embelina mediante la técnica de cambio de solvente en presencia del polímero hidrofílico, polivinilpirrolidona (PVP) [57]. Los cristales se prepararon a partir a partir de una emulsión, empleando como fase orgánica una solución de embelina en acetona, que posteriormente se agregó a soluciones acuosas de PVP de diferentes concentraciones (2,5 – 10 % p/v). Finalmente se adicionaron gotas de solvente diclorometano (DCM), a fin de conseguir la precipitación de los cristales. Los resultados mostraron que la presencia de PVP favorece la formación de los cristales esféricos de embelina, mejorando su empaquetamiento con la mayor concentración de PVP. Además, la presencia del polímero hidrofílico mejora la solubilidad en agua, de los cristales de embelina respecto del agente puro, sin que exista una interacción física o química entre estos, como lo demostró la caracterización térmica y superficial.

Se evaluó la actividad antifertilidad de embelina en ratas hembras albinas Sprague Dawley, a partir de complejos formados con ácido bórico [58]. Este

complejo se formó debido a la tendencia de la embelina de asociarse con metales de transición a partir de sus grupos hidroxilos fenólicos, presentándose como estructuras estables en medios alcalinos, pero altamente inestables en medios ácidos. Los estudios biológicos indicaron alteraciones irregulares de los ciclos de celo de las ratas estudiadas.

Li *et al.* prepararon micelas a partir de lipopolímeros formados por polímeros en bloque de poli(etilenglicol)-poli(2-metil-2-carboxil-carbonato de propileno-dodecanol), como medio para administrar agentes terapéuticos hidrofóbicos y mejorar su solubilidad en medio acuoso [59]. La concentración micelar crítica disminuyó al aumentar la longitud de bloque hidrofóbico y la capacidad de carga resultó dependiente de la longitud del núcleo hidrofóbico. Las micelas de PEG-PCD con embelina mostraron una inhibición significativa de la proliferación de células de cáncer de próstata C4-2, mientras que no se observó citotoxicidad a partir de las micelas sin agente terapéutico.

Finalmente, Huang *et al.* desarrollaron un sistema de micelas a partir de la conjugación de embelina con poli(etilenglicol) a través de un puente de ácido aspártico [60]. Las micelas preparadas no sólo mejoraron la solubilidad de embelina, sino que también permitieron la incorporación del agente terapéutico hidrofóbico paclitaxel, ampliamente utilizado por su actividad como anticancerígeno. Los estudios de citotoxicidad de varias líneas celulares mostraron la eficiencia de las micelas con embelina, potenciada por la presencia de paclitaxel en dosis menores a las frecuentemente empleadas en las terapias. El sistema embelina-PEG resulta entonces un vehículo de gran potencialidad para agentes terapéuticos de baja solubilidad en medio acuoso, permitiendo además disminuir la toxicidad no deseada de estos agentes.

1.4. Estrategias para la obtención de estructuras tridimensionales porosas

El número de publicaciones científicas relacionadas con matrices para ingeniería de tejidos y liberación controlada de agentes terapéuticos, se ha incrementado notablemente en las últimas décadas, hecho que revela un alto y sostenido interés en el diseño y preparación de matrices porosas [61]. Considerando los requisitos que debe reunir una matriz extracelular artificial, la tecnología de procesamiento para su producción debe poseer un control

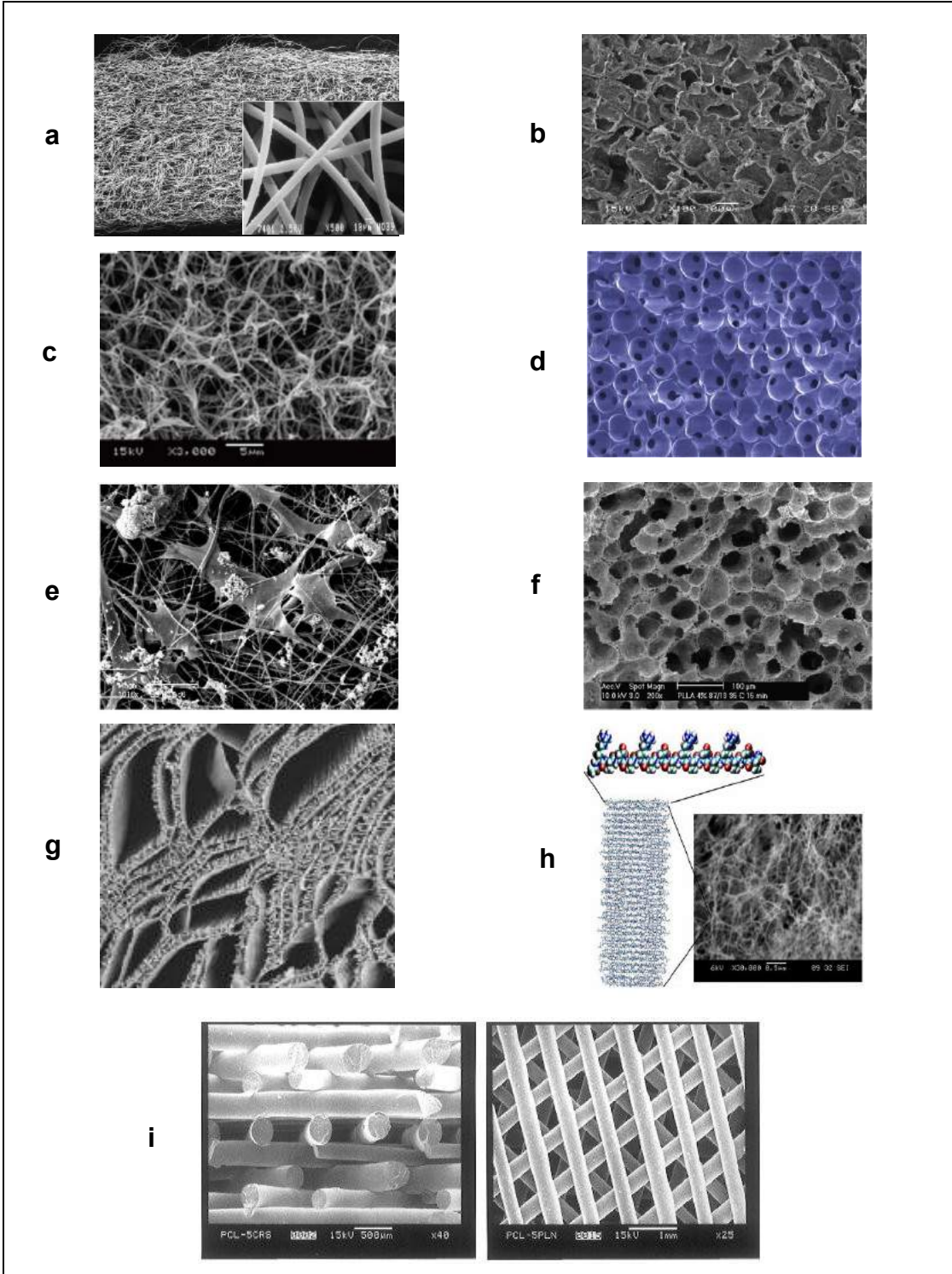
importante de las propiedades a escala micro- y nanométrica. El comportamiento viscoso de los polímeros por encima de su temperatura de transición vítrea o temperatura de fusión y su solubilidad en diferentes solventes orgánicos, determina la aplicación de una amplia variedad de técnicas para preparar matrices porosas [62, 63, 64]. De modo que, no existe una forma universal de crear matrices porosas tridimensionales para regenerar todo tipo de tejido. La elección de la técnica más apropiada depende de cada tipo de material, geometría y aplicación específica. En la Tabla 1.1 se listan algunas de las técnicas disponibles para la preparación de matrices tridimensionales porosas acelulares usando polímeros naturales o sintéticos, materiales cerámicos o nanocompuestos, mientras que en la Fig. 1.3. se ilustran algunos ejemplos de matrices porosas producidas con estas técnicas.

Para proporcionar una mayor funcionalidad biológica se incluyen agentes terapéuticos y genes, integrados desde la etapa de diseño de las matrices porosas. Los esfuerzos actuales se centran en el desarrollo de matrices bioactivas, con arquitectura tridimensional nanofibrosa, superficie biomimética y capacidad para liberar de manera controlada agentes terapéuticos que incluyen fármacos y factores de crecimiento celular.

Tabla 1.1. Técnicas disponibles para la preparación de matrices tridimensionales porosas acelulares.

Técnicas tradicionales	<p>Procesamiento de fibras Mallas de fibras no tejidas entremezcladas, fibras unidas</p>
	<p>Procesamiento de soluciones Evaporación de solvente y disolución de partículas Extracción de hidrocarburos porógenos Autoensamblado inducido por segregación de hielo Electrohilado Autoensamblado molecular</p>

	<p>Separación de fases</p> <ul style="list-style-type: none"> - Separación de fases inducida térmicamente - Separación sólido-líquido: liofilización, técnicas combinadas con disolución de partículas - Inversión de fases y remoción de partículas - Separación de fases inducida por polimerización
	<p>Otras técnicas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Moldeo en fundido - Agregación de micropartículas - Espumado de compuesto polímero-cerámico - Espumado por gas a alta presión - Formación de gas - Mezclado/espumado asistido por CO₂ supercrítico
<p>Tecnologías de manufactura aditiva basadas en CAD/CAM</p>	<p>Fabricación asistida por calor</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sinterizado selectivo por láser (<i>SLS</i>) - Moldeo por deposición de fundidos (<i>FDM</i>) - Impresión tridimensional (<i>3D Plotting</i>) - Laminación (<i>LOM</i>) <p>Fabricación asistida por radiación</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estereolitografía (<i>SLA</i>) <p>Fabricación asistida por adhesivo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Impresión tridimensional (<i>3DP</i>) - Microjeringa asistida por presión (<i>PAM</i>) <p>Fabricación por moldeo indirecto</p>



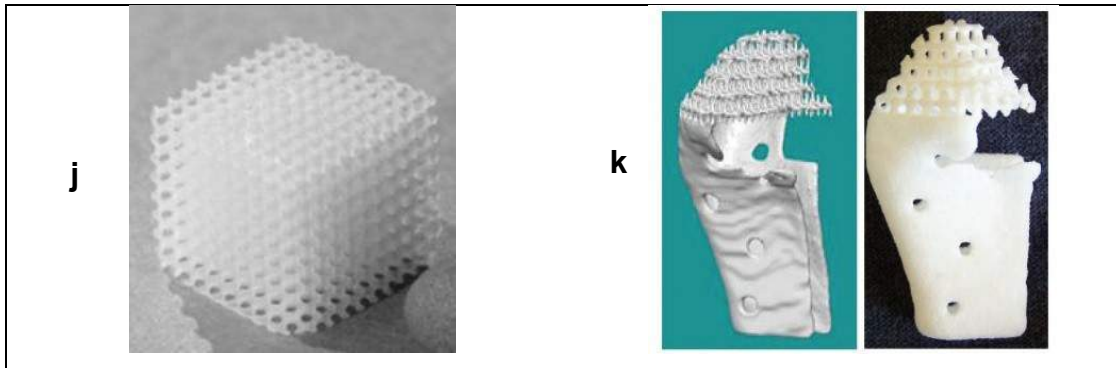


Fig. 1.3. Ejemplos de matrices porosas para aplicaciones en ingeniería de tejidos obtenidas por distintas técnicas, a) mallas de fibras entremezcladas; b) evaporación de solvente y disolución de partículas; c) separación de fases; d) eliminación de porógenos; e) electrohilado; f) separación de fases inducida térmicamente (TIPS); g) autoensamblado inducido por segregación de hielo (ISISA); h) autoensamblado; i) manufactura aditiva: moldeo por deposición de fundido (FDM); j) manufactura aditiva: estereolitografía (SLA); k) manufactura aditiva: Sinterizado selectivo por láser (SLS).

Las nanofibras resultan de notable interés debido a la generación de una estructura altamente porosa de gran relación área/volumen. Las matrices constituidas por nanofibras pueden fabricarse con geometrías que permitan rellenar defectos anatómicos y su arquitectura puede diseñarse para obtener las propiedades mecánicas necesarias para soportar el crecimiento, proliferación, diferenciación y movilidad celular. Asimismo, pueden contener factores de crecimiento, drogas, agentes terapéuticos y genes, para estimular la regeneración de tejidos. Una propiedad inherente de las nanofibras es su alta capacidad de imitar la matriz extracelular de los tejidos y órganos, un complejo compuesto formado por proteínas fibrosas, proteínas solubles y otras moléculas bioactivas que permiten la adhesión y el crecimiento celular. Sin embargo, los estudios de las interacciones célula-nanofibra, la elucidación y el entendimiento completo de la influencia de las nanofibras en las rutas bioquímicas y los mecanismos de las señales que regulan el comportamiento celular requieren de mayor investigación.

Las técnicas mecánicas convencionales de producción de fibras permiten obtener fibras con diámetros en el orden del micrómetro. Si bien estos tamaños

se utilizan en muchas aplicaciones, existen nuevas aplicaciones que requieren fibras con diámetros de decenas a cientos de nanómetros. Las nanofibras se emplean en numerosas aplicaciones nanotecnológicas entre las que se incluyen defensa y seguridad, biomateriales, ingeniería ambiental y biotecnología, almacenamiento de energía, almacenamiento o transporte de gases y fluidos, nano-electrónica, etc [1].

Uno de los métodos de procesamiento que presenta mayores ventajas para la producción de nanofibras es el electrohilado [1, 65, 66, 67]. Las aplicaciones potenciales de las nanofibras en el campo biomédico son enormes y prometedoras: además de matrices para regeneración de tejidos y órganos (injertos vasculares, nervios, piel, cartílago, huesos, músculos cardíacos, córneas, expansión y diferenciación de células madres), se encuentran vectores para liberación de principios activos, dispositivos biomédicos biodegradables implantables, instrumentación y diagnóstico médico, aplicaciones dentales y cosméticas [68, 69, 70].

El autoensamblado molecular u organización autónoma de componentes en patrones o estructuras sin intervención externa, constituye otro campo de investigación emergente, especialmente cuando se trata de estructuras biológicas de tamaño nanométrico o texturizado. Esta estrategia también se emplea en el desarrollo de materiales nanofibrosos [63]. El autoensamblado está generalmente mediado por fuerzas secundarias tales como interacciones iónicas electrostáticas, puente de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y de van der Waals. Los hidrogeles basados en proteínas proporcionan, además de su capacidad de gelación *in situ*, las condiciones necesarias para la proliferación celular y formación de tejidos.

1.5. Procesos electrohidrodinámicos

Los procesos electrohidrodinámicos han sido de interés por muchos años [71]. En 1745, Bose creó un spray en aerosol al aplicar una alta tensión a un líquido en la punta de un capilar de vidrio. Lord Rayleigh calculó la máxima carga que una gota puede soportar antes de que las fuerzas eléctricas superen la tensión superficial de la gota. En 1917, Zeleny describió y fotografió el fenómeno de atomización electrohidrodinámica. Taylor analizó las condiciones

a las que es sometida una gota deformada por un campo eléctrico, y mostró que una interface cónica es estable si el cono tiene un semi-ángulo de $49,3^\circ$. En 1934, Formhals publicó la primera patente de electrohilado, pero la aplicación de estos procesos en ciencia de materiales no ocurrió hasta principios de los 90 como se observa en el enorme incremento de publicaciones y patentes en el tema [72].

Los procesos electrohidrodinámicos más usados en nanotecnología de materiales involucran las técnicas de atomización electrohidrodinámica (EHDA, *electrospraying*) y electrohilado (*electrospinning*). La EHDA consiste en la atomización de un líquido (típicamente una solución diluida) mediante el empleo de un campo eléctrico de alta tensión. El campo eléctrico produce fuerzas eléctricas que estiran el menisco de la gota pendiente de un capilar, formando entonces un microchorro que luego es atomizado en gotas finas. Estas gotas pueden ser de tamaño submicrónico, con una distribución de tamaños angosta. La técnica de EHDA se usa en la producción de nanopartículas, deposición de films finos, y para la formación de capas funcionales. Cuando la viscosidad del líquido alcanza un valor crítico, el microchorro sufre otro tipo de inestabilidades y se forma una fibra continua de tamaño submicrónico, proceso conocido como electrohilado. Estos procesos electrohidrodinámicos son impulsados solamente por el efecto del campo eléctrico aplicado. La morfología de las fibras o gotas depende fuertemente del peso molecular del polímero, los enmarañamientos de las cadenas poliméricas, el/los solvente/s empleados, y la concentración de la solución, entre otros factores [73].

1.5.1. Electrohilado de soluciones poliméricas

La tecnología de electrohilado constituye uno de los métodos de procesamiento de vanguardia que presenta mayores ventajas para la producción de nanofibras. Esta técnica tiene la habilidad única de producir nanofibras de diferentes materiales y geometrías, bajo costo, relativamente alta velocidad de producción y simplicidad en el diseño del equipamiento. En los últimos años, se han electrohilado numerosos tipos de materiales que incluyen prácticamente todos los polímeros sintéticos y algunos naturales que sean

solubles o puedan fundirse, y nanocompuestos, para obtener fibras continuas de unos pocos nanómetros hasta algunos micrones que generan una matriz hilada no tejida altamente porosa [65].

Aunque la técnica de electrohilado constituye una vía muy versátil para la producción de nanofibras, el proceso es sumamente complejo y depende de numerosos parámetros. El diseño experimental básico para electrohilado de soluciones consta de cuatro componentes (Fig. 1.4): un reservorio de solución o material fundido, una bomba de infusión que permite suministrar un flujo constante y controlado de solución, una fuente de alta tensión y un sistema colector sobre el que se deposita el material electrohilado. Al aplicar una tensión de 5 - 30 kV, la solución polimérica se electrifica fuertemente y se generan cargas que se distribuyen sobre la superficie de la gota de solución polimérica que pende de una boquilla. La gota que emerge de la boquilla experimenta un conjunto de fuerzas: fuerza de repulsión coulombica entre las cargas, fuerza electrostática producto del campo eléctrico externo generado al aplicar la tensión, fuerza gravitatoria, fuerzas viscoelásticas que dependen del polímero y solvente, y la tensión superficial que se opone al estiramiento y afinamiento de la gota. Bajo la acción de estas interacciones, la gota se distorsiona en forma cónica, fenómeno conocido como cono de Taylor. En estas condiciones el balance de fuerzas llega a un equilibrio. Cuando las fuerzas electrostáticas repulsivas superan la tensión superficial del polímero, se produce una situación inestable que provoca la expulsión de un microchorro líquido cargado desde la boquilla del capilar. Este microchorro electrificado sufre estiramiento y movimientos tipo látigo (*whipping*), dando lugar a la formación de hilos largos y delgados. A medida que el chorro líquido se deforma continuamente y se evapora el solvente (o solidifica el fundido), las cargas superficiales aumentan conduciendo a una disminución drástica del diámetro de las fibras. Los entrecruzamientos físicos de las cadenas poliméricas permiten dar continuidad al microchorro, formando fibras que se depositan en el sistema colector que se encuentra conectado a tierra [1, 74].

Por lo tanto las propiedades intrínsecas de la solución y los parámetros que afectan el procesamiento tienen un efecto directo en las fuerzas que dominan al proceso de electrohilado y la obtención de fibras con distinta morfología,

estructura y tamaño. La Fig. 1.5 muestra una fotografía del equipo de electrohilado empleado en esta tesis.

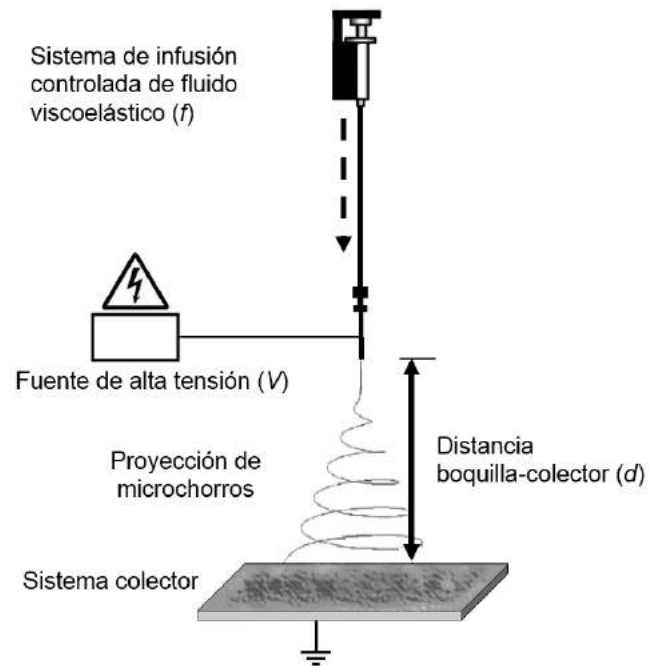


Fig. 1.4. Montaje experimental básico para electrohilado de soluciones poliméricas



Fig. 1.5. Imagen del equipo de electrohilado empleado para procesos electrohidrodinámicos

1.5.1.1. Propiedades intrínsecas de la solución polimérica

Se ha demostrado que los parámetros de la solución influyen notablemente en la obtención de fibras y en la morfología de las mismas. Se describen a continuación algunos de los parámetros más importantes a considerar [74, 75, 76].

Concentración: Se requiere de una concentración crítica para que los entrecruzamientos físicos de las cadenas poliméricas permitan la formación de fibras bajo la acción del campo eléctrico aplicado. Si la concentración de polímero se encuentra debajo de una concentración crítica, los entrecruzamientos físicos entre las cadenas poliméricas no alcanzan a contrarrestar estas fuerzas y el microchorro se rompe, obteniendo un pulverizado de gotas. Un incremento de la concentración puede formar una morfología de gotas conectadas por fibras. La concentración crítica para la cual se obtienen fibras uniformes varía con cada sistema analizado, y depende del peso molecular del polímero (a mayor peso molecular del mismo polímero, menor concentración para igual sistema de solventes), y de la viscosidad de la solución entre otros. Por otro lado, una vez alcanzada la concentración crítica para la obtención de nanofibras, el incremento de la misma produce un aumento en el diámetro medio de las fibras.

Viscosidad: La viscosidad de la solución polimérica está relacionada con el peso molecular del polímero disuelto y el solvente. A mayor peso molecular, mayor es la viscosidad de la solución. La viscosidad actúa contrarrestando las fuerzas de estiramiento producidas por la repulsión electrostática del microchorro cargado. Aumentar la viscosidad ayuda a obtener un microchorro estable y por lo tanto fibras libres de gotas. La viscosidad de la solución se puede aumentar incrementando el peso molecular del polímero, la concentración de la solución polimérica, o incluso también con el agregado de polielectrolitos en pequeñas cantidades que permiten incrementar la viscosidad sin modificar la concentración. Si bien la viscosidad de la solución influye significativamente en generar fibras lisas, no necesariamente determina la concentración crítica a la cual se obtienen fibras por electrohilado.

Solventes: Los solventes utilizados influyen y determinan varios aspectos del proceso de electrohilado. En primer lugar afectan la conformación de las

cadena polimérica en solución, e influyen en la facilidad del transporte de la carga del microchorro. Tanto el momento dipolar como la conductividad de la solución determinan la obtención o no de fibras electrohiladas, así como también el tamaño de las mismas. A mayor polaridad del solvente se obtienen fibras de menor diámetro. La velocidad de solidificación del microchorro también está determinada por el solvente o mezclas de solventes utilizados. Cuanto menor es la temperatura de ebullición del solvente mayor será la velocidad de solidificación del microchorro. No obstante, en ocasiones la solidificación puede ser muy rápida produciendo una obstrucción en la boquilla. Por otra parte cuando la temperatura de ebullición es muy elevada, las fibras alcanzan el colector con una cantidad considerable de solvente que produce un film por aglomeramiento. El empleo de mezclas de solventes de bajo y alto punto de ebullición permite balancear esta situación.

Conductividad: La conductividad de la solución polimérica es fundamental en la producción de fibras por electrohilado, dado que influye en la repulsión electrostática de las cargas superficiales presentes en la solución. La conductividad puede incrementarse por agregado de partículas conductoras o iones a la solución o seleccionando un solvente con mayor polaridad. El aumento de la conductividad de la solución también tiene un efecto en la disminución del diámetro medio de fibras.

Tensión superficial: La tensión superficial de la solución es la fuerza principal a vencer para lograr el estiramiento del microchorro y la producción de nanofibras. Cuanto mayor es la tensión superficial, mayor cantidad de cargas superficiales y tensión aplicada se requerirá en el proceso. Dado que el solvente determina la tensión superficial de la solución, sería ideal emplear un solvente con baja tensión superficial. Sin embargo, la concentración y la naturaleza química del polímero también determinan la tensión superficial. En general, al aumentar la concentración polimérica de la solución disminuye la tensión superficial. Otra forma de disminuir la tensión superficial, es con el agregado de surfactantes a la solución.

Constante dieléctrica: La constante dieléctrica de una solución es una medida de la capacidad para mantener cargas eléctricas en la solución. Cuanto mayor es la constante dieléctrica de la solución, con más facilidad se obtendrán fibras uniformes y de menor diámetro medio. La constante dieléctrica de una

solución se puede variar reemplazando el solvente o una fracción del mismo por uno con mayor o menor constante dieléctrica.

Factores ambientales: Por último, si bien en la mayoría de los casos se realiza el proceso de electrohilado en atmósfera de aire, también puede realizarse en presencia de nitrógeno u otros gases que modifican el proceso de secado del microchorro y la pérdida de cargas eléctricas superficiales al ambiente. Otras condiciones ambientales que afectan el secado del microchorro son la temperatura y humedad ambiente. En particular, la elevada humedad ambiente genera nanofibras con poros superficiales. Esto se debe a que gotas de agua se depositan sobre la superficie del microchorro, debido al enfriamiento del mismo por la evaporación del solvente. Los poros se producen cuando el solvente y el agua se evaporan.

1.5.1.2. Parámetros del proceso de electrohilado

Los parámetros del proceso de electrohilado también poseen una notable influencia en la obtención de fibras y en la morfología de las mismas. A continuación se describen resumidamente los aspectos más importantes a tener en cuenta [74, 75, 76].

Tipo de colector: El colector conductor plano es el más usado para producir una matriz nanofibrosa con orientación al azar (Fig. 1.6.a). Existe una variedad de colectores para favorecer la obtención de matrices con una orientación determinada o para definir estructuras macroscópicas en la membrana. Uno de los colectores utilizados es el colector rotatorio, ya sea en la forma de cilindro o como disco (Fig. 1.6.b). La velocidad de rotación es el factor dominante en el grado de alineación de las fibras. Si bien el colector de disco produce una mejor alineación, el cilindro de diámetro grande genera una matriz de mayor tamaño. Para mejorar la alineación, se han desarrollado cilindros con barras paralelas con separación de 2 - 3 cm, combinando el efecto de la rotación con la modificación del campo eléctrico. Otro tipo de colectores rotatorios son los cilindros de pequeño diámetro (< 6 mm), estos son de gran interés ya que permiten desarrollar estructuras 3D ideales para ingeniería de injertos vasculares. Los colectores de placas paralelas (Fig. 1.6.c) también

pueden producir matrices con fibras alineadas. Si bien estos colectores logran alinear las nanofibras, algunos con gran efectividad, el tamaño de la matriz obtenida es pequeño. El colector de punta produce matrices de gran superficie con nanofibras alineadas, y se presenta como una alternativa a los colectores existentes. En este caso las fibras son eyectadas una a la vez y se alinean por repulsión electroestática entre la fibra ya depositada y la nueva (Fig. 1.6.d).

Material del colector: El material del colector influye en la estructura de la matriz obtenida. Por lo general, se utilizan colectores conductores conectados a tierra, ya que de esta manera el exceso de carga presente en la nanofibras depositadas es eliminado permitiendo un empaquetamiento compacto de las mismas. No obstante, en algunas aplicaciones se han utilizado colectores no conductores y se han obtenido empaquetamientos menos densos de fibras. Incluso, altos tiempos de deposición o una alta velocidad de flujo pueden producir empaquetamientos poco densos de fibras. En estos casos, donde una capa considerable de fibras no conductoras cubre el colector, la eliminación de cargas se dificulta obteniendo un efecto similar al de tener un colector no conductor. La deposición de nanofibras en agua antes de la colección por un colector conectado a tierra produce un efecto significativo en la morfología de las fibras obtenidas y también aumenta la densidad de empaquetamiento.

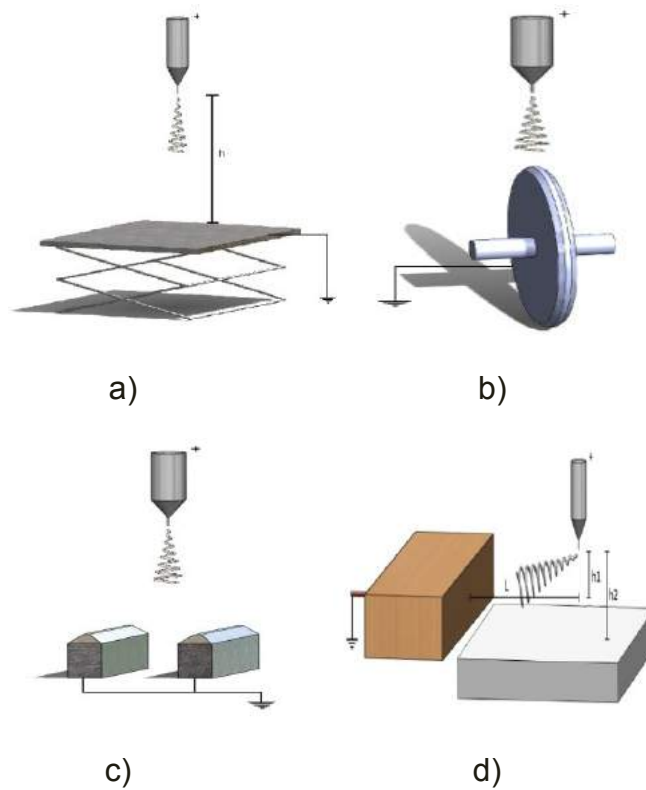


Fig. 1.6. Tipos de colector utilizados en el proceso de electrohilado; a) colector plano, b) colector rotatorio de disco, c) placas paralelas, y d) colector de punta.

Tensión aplicada: La tensión aplicada a la solución polimérica, carga superficialmente la misma, generando las fuerzas electroestáticas necesarias para vencer la tensión superficial. El efecto que tiene este parámetro en las nanofibras obtenidas depende fuertemente del sistema estudiado y de las demás que intervienen, como la concentración o la distancia boquilla-colector. Se ha demostrado que al aumentar la tensión aplicada se producen mayores cargas superficiales, lo que favorece el afinamiento del microchorro, resultando en fibras de menor diámetro. Sin embargo, la aplicación de una tensión alta también produce la evaporación más rápida del solvente y en consecuencia puede suprimir etapas de estiramiento y disminución del diámetro del microchorro, obteniéndose en algunos casos fibras de mayor tamaño del esperado. En algunos casos no se observa ninguna tendencia en el diámetro al variar la tensión aplicada.

Velocidad de infusión: Para que el proceso de electrohilado sea satisfactorio debe existir un equilibrio entre la velocidad a la cual la solución es

dosificada y la velocidad de remoción de la misma por efecto del campo eléctrico aplicado. Por lo general, la velocidad de flujo es controlada mediante una bomba que infunde la solución a una velocidad constante determinada por el usuario. Si bien, el mayor efecto de este parámetro es la obtención o no de un microchorro continuo, el aumento de la velocidad de flujo aumenta el diámetro medio de fibras, aunque se debe tener en cuenta que si la cantidad de solvente en el colector es apreciable se perderá la estructura fibrosa por disolución de las fibras.

Boquilla capilar: El diámetro interno de la boquilla influye en el diámetro de las nanofibras, y en la velocidad de evaporación del solvente en la boquilla. Al disminuir el diámetro interno de la boquilla aumenta la tensión superficial de la solución, por lo tanto a igual tensión aplicada se necesita de una mayor fuerza coulombica para vencerla. La aceleración del microchorro disminuye y posee mayor tiempo de estiramiento y elongación antes de ser depositado en el colector, generando fibras de menor diámetro. Los sistemas de producción industrial emplean un sistema de dosificación sin boquillas, evitando la interferencia eléctrica que se genera cuando se utilizan simultáneamente múltiples boquillas. Las boquillas coaxiales permiten obtener nanofibras con un núcleo interno y un recubrimiento exterior o nanofibras huecas.

Distancia boquilla - colector: Este parámetro influye directamente en el tiempo de vuelo del microchorro y en la fuerza del campo eléctrico aplicado. En consecuencia, variar este parámetro influye en el diámetro medio de fibras obtenidas y en su morfología. Si la distancia es alta, hay un mayor tiempo para que el microchorro se elongue y estire, lo que produce matrices con tamaño medio de fibra menor. No obstante, el aumentar la distancia se debilita la magnitud del campo eléctrico, resultando en menor estiramiento del microchorro y un mayor tamaño medio de fibra. Si la distancia es muy pequeña, la fuerza del campo eléctrico es mayor y se produce una mayor aceleración del microchorro, pero como el tiempo de vuelo también disminuye la evaporación del solvente es pobre.

1.6. Objetivos de la tesis e hipótesis

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en preparar y caracterizar sistemas poliméricos con morfología controlada, mediante el desarrollo y aplicación de diferentes procesos de fabricación, conduciendo a la generación de sistemas con capacidad para actuar como vectores para liberación de embelina, agente terapéutico poco soluble en agua. En el marco de este objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Preparar sistemas poliméricos porosos y particulados basados en poli(ϵ -caprolactona) como poliéster biorreabsorbible y biocompatible, con distinto contenido de embelina, agente terapéutico de origen natural.
- Optimizar los parámetros del proceso de electrohilado para preparación de estructuras micro/nanofibras poliméricas con morfología controlada.
- Desarrollar estructuras tridimensionales con morfología reproducible y diferente porosidad.
- Caracterizar todos los sistemas preparados mediante técnicas de análisis fisicoquímico, térmico, y superficial.
- Estudiar la relación estructura – propiedades de los sistemas electrohilados y particulados.
- Aplicar distintas técnicas de evaluación de la morfología para el análisis de biomateriales poliméricos porosos y particulados.
- Estudiar la cinética de liberación de embelina de los sistemas poliméricos en soluciones reguladoras con diferente pH, determinando el modelo cinético que mejor representa el comportamiento del sistema.

Este trabajo se basa en la siguiente hipótesis: es posible obtener sistemas poliméricos biorreabsorbibles de poli(ϵ -caprolactona) con diferente contenido embelina, morfología (matricial y particulado) y porosidad controlada. Los

sistemas diseñados permiten la liberación de embelina en medios con diferente pH, con un control del perfil y la cinética de liberación.

1.7. Referencias

- [1] S. Ramakrishna, K. Fujihara, T. Wee-Eong, T. Yong, Z. Ma, R. Ramaseshan, "Electrospun nanofibers: Solving global issues". *Materials Today*, 9(3), 40 - 50, 2006.
- [2] S.G. Kumbar, S.P. Nukavarapu, R. James, MC.V. Hogan, C.T. Laurencin, "Recent Patents on Electrospun Biomedical Nanostructures: An Overview". *Academic Journal*, 1(1), 68 - 78, 2008.
- [3] G.A. Abraham, P.C. Caracciolo, F. Buffa, T.R. Cuadrado, "Diseño y Preparación de Matrices Poliméricas Porosas para Ingeniería de Tejidos Biológicos". *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 59, 105 - 130, 2007.
- [4] E. Engel, A. Michiardi, M. Navarro, D. Lacroix, J.A. Planell, "Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side". *Trends in Biotech.*, 26(1), 37 - 47, 2008.
- [5] S. Sell, C. Barnes, M. Smith, "Extracellular matrix regenerated: tissue engineering via electrospun biomimetic nanofibers". *Polym. Int.*, 56, 1349 - 1360, 2007.
- [6] L. Zhang, T.J. Webster, "Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration". *Nano Today*, 4, 69 - 80, 2009.
- [7] N. Bhardwaj, S.C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique". *Biotech. Adv.*, 28, 325 - 347, 2010.
- [8] T.J. Sill, H.A. von Recua, "Review Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering". *Biomaterials*, 29, 1989 - 2006, 2008.
- [9] D-G. Yu, L-M. Zhu, K. White, C. Branford-White, "Electrospun nanofiber-based drug delivery systems". *Health.*, 1(2), 67 - 75, 2009.
- [10] V.R. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, A. Trehan, "Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview". *Int. J. Pharm.*, 278(1), 1 - 23, 2004.
- [11] F. Rocha Formiga, E. Ansorena, A. Estella-Hermoso de Mendoza, E. Imbuluzqueta, D. González, MJ. Blanco Prieto, "Nanosistemas a base de poliésteres", de *Nanotecnología farmacéutica, realidades y posibilidades farmacoterapéutica*, Ed. V. Jato. Madrid, Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia, 2009, 41 - 101.
- [12] V. Sáez, E. Hernández, L. Sanz, "Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros". *Rev. Iberoam. Polim.*, 5, 55 - 70, 2004.
- [13] S. Guinebreière, S. Briancon, H. Fessi, V. Teodorescu, M. Blanchin, "Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy". *Mat. Sci. Eng. C*, 21, 137 - 142, 2002.
- [14] R. Katara, D.K. Majumadar, "Eudragit RL 100-based nanoparticle system of

- aceclofenac for ocular delivery". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 455 - 462, 2013.
- [15] J. Piñero, R.M. Temporal, Silva Goncalves, I.A. Jimenez, I.L. Brazzocchi, A. Oliva, A. Perera, L.L. Leon, B. Valladares, "New administration model of trans-chalcone biodegradable polymer for the treatment of experimental leishmaniasis". *Acta Trópica*, 98, 59 - 65, 2006.
- [16] D. Williams, *Definitions in biomaterials*, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1987.
- [17] P. Doherty, R.L. Williams, D.F. Williams, A.C. Lee, *Biomaterials-tissue interfaces*, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1992.
- [18] D. Williams, *The Williams dictionary of biomaterials*, Liverpool, UK: Liverpool University Press, 1999.
- [19] D. Williams, "On the nature of biomaterials". *Biomaterials*, 30(30), 5897 - 5909, 2009.
- [20] R. Langer, J.P. Vacanti J.P, "Tissue engineering". *Science*, 260(5110), 920 - 926, 1993.
- [21] Y. Ikada, "Challenges in tissue engineering". *J. R. Soc. Interface*, 3(10), 589 - 601, 2006.
- [22] R.P. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, *Principles of tissue engineering*, 2nd Edit, San Diego CA, USA: Academic Press, 2000.
- [23] M.J. Lysaght, J. Reyes, "The growth of tissue engineering". *Tissue Eng.*, 7(5), 485 - 493, 2001.
- [24] R.M. Nerem R.M., "Tissue engineering: the hope, the hype, and the future". *Tissue Eng.*, 12(5), 1143 - 1150, 2006.
- [25] A.S. Daar, H.L. Greenwood, "A proposed definition of regenerative medicine". *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 1(3), 179 - 184, 2007.
- [26] A. Atala, "Engineering tissues, organ and cells". *J. tissue Eng. Regen. Med.*, 1(2), 83 - 96, 2007.
- [27] N.D. Evans, E. Gentleman, J.M. Polak , "A novel in vitro three-dimensional macroporous scaffolds from bacterial cellulose for culture of breast cancer cells". *Materials Today*, 12(9), 26 - 33, 2006.
- [28] M.J. Lysaght, A.L. Hazlehurst, "Private sector development of stem cell technology and therapeutic cloning". *Tissue Eng.*, 9(3), 555 - 561, 2003.
- [29] M.E. Gomes, R.L. Reis , *Macromol. Biosci.* , 4, 737 - 742, 2004.
- [30] H.C. Ansel, N.G. Popovich, *Pharmaceutical dosage form and drug delivery systems*, Philadelphia: Lea & Febiger, 1990.
- [31] G.S. Banker, Ch.T. Rhodes, *Modern Pharmaceutics*, New York: Marcel Dekker Inc., 1990.
- [32] Y. Chien, *Novel drug delivery systems*, New York: Marcel Dekker Inc., 1992.
- [33] C. F. Trillo, *Tratado de farmacia galénica*, Madrid: Luzán 5 S.A., 1993.
- [34] S. Yolles, J.E. Eldridge, J.H.R. Woodland, "Sustained delivery of drugs from polymer drug mixtures". *Polym. News*, 1(4 - 5), 9 - 15, 1971.
- [35] G.A. Boswell, "Polylactid-Arzneimittel-Mischungen". Germany Patente 2051580, 6 may 1971.

- [36] J.H.R. Woodland, S. Yolles, D.A. Blake, M. Helrich, F. Meyer, "Long-acting delivery systems for narcotic antagonists". *J. Med. Chem.*, 16(8), 897 - 901, 1973.
- [37] S. Yolles, J.E. Eldridge, T.D. Leafe, J.H.R. Woodland, D.A. Blake, F.J. Meyer, "Long-acting delivery systems for narcotic antagonists". *Adv. Exp. Med. Biol.*, 47, 177, 1973.
- [38] P. Sinko, J. Kohn, "Polymeric drug delivery systems: An overview". de *Polymeric delivery systems: Properties and applications*, Washington, DC, The Procter & Gamble Company, Syntex Research, 1992, pp. 19 - 41.
- [39] J.S. Negre, "Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración". *Formación continua para farmacéuticos de hospital*, Barcelona, Fundación Promedic, 2004, 27 - 65.
- [40] K. Haq, M. Ali, A.W. Siddiqui, "New compounds from the seeds of *Embelia ribes burm*". *Pharmazie*, 60, 69 - 71, 2005.
- [41] S. Raja, K.P. Unnikrishnan, P.N. Ravindran, I. Balachandran, "Determination of embelin in *Embelia ribes* and *Embelia tsjeriam-cottam* by HPLC". *Indian J. Pharm. Sci.*, 67, 734 - 736, 2005.
- [42] G.E. Feresin, A. Tapia, M. Sortino, S. Zacchino, A.R. de Arias, A. Inchausti, G. Yaluff, J. Rodriguez, C. Theoduloz, G. Schmeda-Hirschmann, "Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*". *J. Ethnopharmacol*, 88, 241 - 247, 2003.
- [43] H.M. Kumara Swamy, V. Krishna, K. Shankarmurthy, B. Abdul Rahiman, K.L. Mankani, K.M. Mahadevan, B.G. Harish, H. Raja Naika, "Wound healing activity of embelin isolated from the ethanol extract of leaves of *Embelia ribes Burm*". *J Ethnopharmacol*, 109(3), 529 - 534, 2007.
- [44] H. Ogawa, S. Natori, "Hydroxybenzoquinones from Myrsinaceae plants II – Distribution among Myrsinaceae plants in Japan". *Phytochem.*, 7, 773 - 782, 1968.
- [45] R. Poojari, "Embelin, a drug of antiquity: shifting the paradigm towards modern medicine". *Expert Opin. Investig. Drugs*, 23(3), 427 - 444, 2014.
- [46] Anonymous, Pharmacognosy of indigenous drugs. Central Council for Research in Ayurveda and Siddha, New Delhi, 1999, 1046 - 1061.
- [47] R.N. Chopra, I.C: Chopra, K. Handa, Indigenous drugs of India, Calcutta: Dhur UN and Sons Press, 1958, 597; 672.
- [48] P.C. Sharma, M.B. Yelne, T.J. Dennis, "Database on medicinal plants used in ayurveda and siddha". de *Central Council for Research in Ayurveda and Siddha*, New Delhi, 2002, 478 - 499.
- [49] M. Sreepriya, G. Bali, "Chemopreventive effects of embelin and curcumin against N-nitrosodiethylamine/phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats". *Fitoterapia*, 76, 549 - 555, 2005.
- [50] E. Wango, "Anti-fertility effects of embelin in female Sprague-Dawley rats may be due to suppression of ovarian function". *Acta. Biol. Hung.*, 56, 1 - 9, 2005.
- [51] I. Podolak, A. Galanty, Z. Janeczko, "Cytotoxic activity of embelin from *Lysimachia punctata*". *Fitoterapia*, 76, 333 - 335, 2005.
- [52] S. Mahendran, B.S. Thippeswamy, V.P. Veerapur, "Anticonvulsant activity of embelin isolated from *Embelia ribes*". *Phytomed.*, 8, 186 - 188, 2011.

- [53] S. Mahendran, S. Badami, V. Maithili, "Evaluation of antidiabetic effect of embelin from *Embelia ribes* in alloxan induced diabetes in rats". *Biomed. Pharmacother.*
- [54] R.K. Patel, K. Pundarikakshudu, M. Momin, M.M. Patel, "Studies on formulation and in vitro dissolution of embelin tablets". *Indian J. Pharm. Sci.*, 68, 227 – 230, 2006.
- [55] M. Danquah, F. Li, Ch.B. Duke III, D. D. Miller, R.I. Mahato, "Micellar Delivery of Bicalutamide and Embelin for Treating Prostate Cancer". *Pharmaceutical Research*, 9(26), 2081 - 2092, 2009.
- [56] G. Arumugam, Ch. Krishnan, M. Babu, S. Maanvizhi, "Preparation and Characterization of Embelin Nanoparticle". de *2nd International Conference on Chemical, Environmental and Biological Sciences (ICCEBS'2013)*, Dubai, 2013.
- [57] M.V. Gadhave, S.K. Banerjee, "Preparation and Characterization of Spherical Crystals of Embelin to Improve the Solubility and Micromeritic Properties". *Intern. J. Pharm. Clin. Res.*, 6(4), 363 - 369, 2014.
- [58] I.P. Singh, S.B. Bharate, A. Singh, K.K. Bhutani, "Fate of embelin in Pippalyadi Yoga, an Ayurvedic oral contraceptive: Structure of embelin-borax complex and evaluation of anti-fertility activity". *Indian J. Chem.*, 46B, 320 - 325, 2007.
- [59] F. Li, M.I. Danquah, R.I. Mahato, "Synthesis and Characterization of Amphiphilic Lipopolymers for Micellar Drug Delivery". *Biomacromolecules*, 11, 2610 - 2620, 2010.
- [60] Y. Huang, J. Lu, X. Gao, J. Li, W. Zhao, M. Sun, D.B. Stolz, R. Venkataramanan, L.C. Rohan, S. Li, "PEG-Derivatized Embelin as a Dual Functional Carrier for the Delivery of Paclitaxel". *Bioconjugate Chem.*, 23, 1443 - 1451, 2012.
- [61] D.W. Hutmacher, *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Cap 6, J. S. Román, R.L. Reis, Ed., Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2005.
- [62] J.M. Karp, P.D. Dalton, M.S. Shoichet, *MRS Bulletin*, 4(28), 4, 301 - 306, 2003.
- [63] J. E. P.X. Ma, *Scaffolding in tissue engineering*, Boca raton, FL, USA: CRC Press, 2005.
- [64] R.C. Thomson, A.K. Shung, M.J. Yaszemski, A.G. Mikos, *Principles of tissue engineering*, Cap 21, 2nd Edit., R.S. Langer, J.P. Vacanti. R.P. Lanza, Ed., USA: Academic Press, 2000.
- [65] A. Greiner, J.H. Wendorff, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 46(30), 5670 - 703, 2007.
- [66] D. Li, Y. Xia , *Adv. Mater.* , 16(14), 1151 – 1170, 2004.
- [67] S. Tan, X. Huang, B.Wu , "Some fascinating phenomena in electrospinning processes and applications of electrospun nanofibers". *Polym. Int.* 11(56), 1330 - 1339, 2007.
- [68] S.R. Bhattarai, N. Bhattarai, H.K. Yi, P.H. Hwang, D.I. Cha, H.T. Kim, "Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering". *Biomaterials*, 25, 2595 - 2602, 2004.
- [69] S. Liao, B. Li, Z. Ma, H. Wei, C. Chan, S. Ramakrishna, "Biomimetic

- electrospun nanofibers for tissue regeneration". *Biomed. Mater.*, 1(3), R45 - 53, 2006.
- [70] R. Murugan, S. Ramakrishna, "Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies". *Tissue Eng.*, 12(3), 435 - 447, 2006.
- [71] N. Tucker, J. J. Satnger, M. P. Staiger, H. Razzaq, K. Hofman, *J. Eng. Fibers and Fabrics*, 7(63), 63 - 73, 2012.
- [72] J. Doshi, D. H. Reneker, "Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers". *J. Electrostatics*, 35, 151 - 156, 1995.
- [73] A. Jaworek, A. Krupa, M. Lackowski, A. T. Sobczyk, T. Czech, S. Ramakrishna, S. Sundarajan, D. Pliszka, "Electrospinning and Electrospaying Techniques for Nanocomposite Non-Woven Fabric Production". *Fibres & textiles in eastern Europe*, 4(75), 77 - 81, 2009.
- [74] A.L. Andradý, Science and technology of polymer nanofibers, New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2008.
- [75] S.Ramakrishna, K. Fujihara, W-E. Teo, T-Ch. Lim, Z. Ma, An Introduction to electrospinning and nanofibers, New Jersey, London, Singapur: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2005.
- [76] L.A. Bosworth, S. Downes, Electrospinning for tissue regeneration, Oxford-Cambridge-Philadelphia-NewDelhi: Woodhead publishing, 2011.
- [77] P.R Cortez Tornello, G.E. Feresin, A. Tapia, I.G. Veiga, Â.M. Moraes, G.A. Abraham, T.R. Cuadrado, "Dispersion and release of embelin from electrospun, biodegradable, polymeric membranes". *Polymer Journal*, 44, 1105 - 1111, 2012.
- [78] S. Yang, K-F. Leong, Z. Du, Ch-K. Chua, "The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques". *Tissue Eng.*, 8 (1), 1- 11, 2002.
- [79] G.A. Abraham, J.V. Cauich-Rodriguez, C. Peniche, A. Gallardo, Biomateriales, Cap. 6, S. de Asa, J. S. Román, R. Sastre, Ed., Faenza, Italia: Faenza Editrice Iberica S.L., 2004.
- [80] C. Mauri Agrawal, Polymer based systems on tissue engineering. NATO-ASI Science series. Series II 86, 113, D. C. R.L. Reis, Ed., The Netherland: Kluwer Academic Publisher, 2002.
- [81] G. Wei, P.X. Ma, "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials*, 25(19), 4749 - 4757, 2004.
- [82] H.M. Kumara Swamy, V. Krishna, K. Shankarmurthy, B. Abdul Rahiman, K.L. Mankani, K.M. Mahadevan, B.G. Harish, H. Raja Naika, "Wound healing activity of embelin isolated from the ethanol extract of leaves of *Embelia ribes* Burm". *J. Ethnopharmacol.*, 109, 529 - 534, 2007.

Capítulo 2

Obtención y caracterización de matrices poliméricas micro/nanofibrosas

2.1. Introducción

En los últimos años la ciencia e ingeniería de biomateriales está mostrando importantes avances en el desarrollo de biomateriales poliméricos y compuestos con estructuras y morfologías micro- y/o nanométricas para su empleo como sistemas de liberación controlada y vectorizada de agentes terapéuticos y en la obtención de matrices extracelulares artificiales para ingeniería de tejidos [1, 2, 3]. Las matrices poliméricas con estructura porosa tienen un enorme interés en el campo de la regeneración de tejidos y órganos.

Como se mencionó en el capítulo anterior, una de las estrategias más exploradas de la ingeniería de tejidos requiere del empleo de matrices porosas biocompatibles y biorreabsorbibles con una serie de requerimientos específicos, células y señales físicas y químicas para la regeneración completa de tejidos funcionales. En el caso de matrices poliméricas, estas buscan imitar el microentorno de una matriz extracelular nativa, por lo que se emplean matrices poliméricas biocompatibles que posean una combinación de topografías del orden de la micro- y nano-escala.

Las matrices micro/nanofibrasas se utilizan en diversas aplicaciones bio y nanotecnológicas debido a que poseen características funcionales atractivas para estas aplicaciones como son: elevada relación de área superficial respecto de su volumen, elevada porosidad interconectada y propiedades biomiméticas. Por todo esto resultan ideales para aplicaciones de ingeniería de tejidos donde se requiere el transporte de oxígeno e intercambio de nutrientes que resultan cruciales para la adhesión, proliferación, diferenciación y regeneración del tejido [4, 5, 6, 7, 8].

El desempeño exitoso de muchas aplicaciones que emplean estructuras micro/nanofibrasas se encuentra estrechamente asociado con una estructura porosa abierta. Por lo tanto, resulta muy importante el estudio de los factores más relevantes que determinan el tamaño de poro y la distribución de tamaño de poro de las estructuras electrohiladas. Existen algunos modelos teóricos que estudian la relación entre el diámetro medio de fibra y el tamaño de poro medio de las membranas nanofibrasas [9, 10]. Estos modelos demuestran que el

diámetro medio de fibra de las matrices juega un rol importante en el control del diámetro medio de poro, de modo tal que el diámetro medio de poro se incrementa con el aumento del diámetro medio de fibra. Esto significa que el diámetro medio de fibra se debe controlar cuidadosamente, y en consecuencia puede afectar la infiltración y la proliferación celular.

En la actualidad, existe una escasa comprensión sobre las características de los poros en las matrices electrohiladas. Dado que es posible obtener matrices con diferente diámetro medio de poro y la misma porosidad, es necesario caracterizar las estructuras indicando los valores de porosidad, diámetro medio y distribución de tamaño de poros. Por lo tanto, resulta esencial contar con las técnicas apropiadas para medir precisamente tanto diámetro medio de poro como así también la porosidad, a los efectos de producir matrices biológicamente aceptables, apropiadas para cada tipo particular de tejido.

Entre las técnicas disponibles para la caracterización de matrices porosas se encuentran la porosimetría de intrusión de mercurio [11], porosimetría de flujo capilar [12], porosimetría de extrusión de líquidos [13, 14], adsorción de gases, microtomografía computarizada de rayos-X (μ -CT) [15], microscopía laser confocal [16], y el análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) [17, 18], cada una de las cuales posee sus ventajas y desventajas [15].

La porosimetría de intrusión de mercurio es una reconocida técnica empleada para el estudio de materiales porosos. Mediante esta técnica se mide la presión necesaria para introducir mercurio, un líquido que no moja la superficie del material, a través de los poros del material. Los equipos comerciales poseen típicamente una presión máxima de 60000 psi (414 MPa), lo que permite el ingreso del mercurio y detección de poros de alrededor de unos 0,003 μ m de diámetro. Una de las desventajas que posee esta técnica consiste en que se requiere una elevada presión para forzar al mercurio viscoso a introducirse en los poros de menor diámetro. Esto puede distorsionar la estructura de los materiales poliméricos porosos, como es el caso de las matrices micro y nanofibras, por lo que se altera la arquitectura porosa real de las mismas. Por otro lado, el mercurio es altamente tóxico, y se requiere de

un proceso de descontaminación posterior a la medición. La porosimetría de mercurio no es apropiada para la medición de matrices frágiles compresibles, tales como espumas (con porosidades superiores a 90 %), textiles y matrices nanofibrasas [11]. Por otro lado, Pham *et al.* reportaron que no es posible medir el tamaño de poro de matrices fibrosas con diámetro medio de fibra menor a 4 μm , debido a que la presión inicial necesaria para llenar con mercurio el espacio libre en la cámara de medición es de 0,6 psi [19].

La porosimetría de flujo capilar provee una técnica no destructiva que permite la medición rápida y precisa del tamaño de poro y distribución de poro [13, 14, 20]. Se emplea un gas no reactivo (usualmente aire) que fluye a través de la muestra seca, y luego a través de la misma muestra pero saturada con un líquido de tensión superficial conocida. El cambio de flujo de aire se mide como una función de la presión aplicada en ambos procesos. Dado que la presión aplicada durante el proceso de medición es lo suficientemente baja, las estructuras porosas de las matrices nanofibrasas no sufren alteraciones [21]. Esta técnica no permite medir volumen de poro pero si mide el diámetro de cuello de poro, que se refiere al diámetro de la porción más estrecha de un poro determinado, y que no es posible medir mediante porosimetría de intrusión de mercurio ni mediante porosimetría de extrusión de líquidos.

Por otro lado, en la porosimetría de extrusión de líquidos (LEP) los poros se llenan espontáneamente con un líquido no reactivo, que permite la saturación de la muestra porosa. Posteriormente el líquido se extruye de los poros de la muestra de manera selectiva, empleando un gas no reactivo. La porosimetría LEP permite medir el volumen, el tamaño y la distribución de poros de la muestra, como así también el área superficial, la porosidad total, y la permeabilidad del líquido, evitando el uso de líquidos tóxicos y altas presiones. Por lo tanto, resulta una técnica adecuada para la caracterización de matrices poliméricas micro/nanofibrasas, con diámetros de poro en el rango de 1000 μm a 0,05 μm . Esta técnica se emplea en la caracterización de estructuras porosas complejas de filtración media, particularmente en procesos relacionados con la biotecnología [13]. Sin embargo, los reportes bibliográficos de aplicación de LEP en la caracterización de matrices para aplicaciones biomédicas son muy escasos [22].

La técnica de adsorción de gases permite medir el tamaño de poro y la porosidad, aunque posee como desventaja el prolongado tiempo de estudio que se insume por cada muestra analizada. Por otro lado, la microtomografía computarizada de rayos X posee importantes ventajas para la caracterización de matrices porosas, aunque tiene limitaciones dadas por la capacidad de procesamiento computacional de *software* y *hardware* empleados [15]. Además, resulta una técnica muy costosa e inaccesible para muchas instituciones.

Finalmente, la microscopía confocal de barrido laser asociada con análisis de imágenes tridimensionales, emerge como una nueva modalidad de análisis de estructuras porosas [16]. Algunas limitaciones asociadas a esta técnica incluyen, la necesidad de contar con un material con emisión fluorescente y la dificultad para establecer los umbrales de detección.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es un ensayo destructivo que requiere seccionamiento físico de la muestra a ensayar y provee información cualitativa de regiones asociadas a la superficie de la muestra. El desarrollo de métodos basados en el análisis de las imágenes permite obtener información cuantitativa de parámetros asociados con la estructura porosa.

En este capítulo se presenta la obtención, caracterización y análisis de una serie de matrices micro y nanofibrosas con diámetro medio de fibra comprendido en el rango de 0,4 a 7 μm . La caracterización se lleva a cabo a través del análisis de imágenes SEM para la medición del diámetro medio de fibra, de mediciones por LEP para determinar el diámetro medio de poro y su distribución, y la evaluación de la porosidad de las matrices un conjunto de técnicas que incluyen mediciones gravimétricas, intrusión de líquido, análisis de imágenes SEM, y mediciones por LEP. Los resultados de porosidad se analizan comparativamente, considerando la precisión de cada técnica empleada. Por último y a fin de comparar los datos empíricos de tamaño de poro obtenidos a partir de LEP, se aplica un modelo teórico multiplanar para matrices estocásticas fibrosas desarrollado por Eichhorn y Sampson [9, 10].

2.2. Obtención de matrices poliméricas

2.2.1. Materiales

Las matrices micro/nanofibrosas se prepararon empleando poli(ϵ -caprolactona) (PCL) de peso molecular promedio en peso $80 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$. PCL es un poliéster lineal y alifático, obtenido mediante polimerización por apertura de anillo del monómero cíclico ϵ -caprolactona [23].

La PCL posee un carácter hidrofóbico, una morfología semicristalina y exhibe una muy buena solubilidad en solventes orgánicos y compatibilidad para la formación de mezclas. Entre las propiedades térmicas PCL posee una temperatura de fusión relativamente baja, comprendida entre 58 y 64 °C, y una temperatura de transición vítrea de -60 °C. En condiciones fisiológicas, se degrada mediante hidrólisis de sus enlaces éster, dando lugar al ácido 6-hidroxicaproico y la velocidad de este proceso depende de la forma, del tamaño del material y de los aditivos. En el proceso de degradación primero ocurre una ruptura de cadenas, de forma que disminuye el peso molecular, y posteriormente estas cadenas, más pequeñas, son transportadas fuera del sitio de implantación por los fluidos del cuerpo o por fagocitosis. El homopolímero puede degradarse en un período comprendido entre dos y cuatro años, pero la velocidad de degradación puede modularse física, química y/o biológicamente para diseñar cinéticas de degradación que se ajusten al sitio anatómico específico.

La biocompatibilidad ha sido muy estudiada, especialmente del Capronor™ que es un dispositivo anticonceptivo válido durante 18 meses. El agente activo es el progestágeno levonorgestrol, se presenta en cápsulas sub-cutáneas. Se ha demostrado que el polímero no es tóxico, excepto por una pequeña irritación en lugar del implante.

Todas estas características han estimulado la investigación de la PCL, sus copolímeros y mezclas en numerosas aplicaciones biomédicas en liberación controlada de fármacos de tiempo prolongado y matrices porosas para ingeniería de tejidos [24, 25, 26, 27].

La PCL está aprobada por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para aplicaciones específicas usadas en seres humanos tales como dispositivos de liberación de fármacos, suturas, o barreras de adhesión.

En la Fig. 2.1 se muestra la estructura química de la PCL.

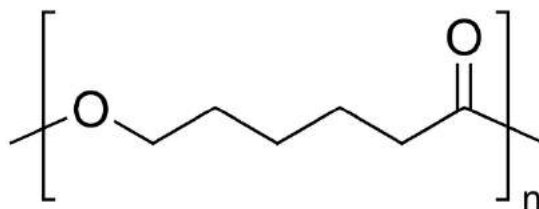


Fig. 2.1. Estructura química de poli(ϵ -caprolactona), según nomenclatura IUPAC (1,7)-polioxepan-2-ona. De acuerdo a los métodos de síntesis empleados, los extremos de cadena suelen tener grupos hidroxilos.

Las matrices poliméricas se prepararon a partir de soluciones del polímero en mezclas de solventes orgánicos. Los solventes empleados fueron diclorometano (DCM), metanol (MeOH), *N,N*-dimetilformamida (DMF) y cloroformo (CLF), obtenidos de Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA), los que se emplearon tal como se recibieron, sin purificación adicional. Algunas técnicas de medición de porosidad requirieron del uso de vaselina líquida medicinal (Drosanto®, 33,0-35-6 cSt a 40°C) comprada a la Droguería San Antonio (Buenos Aires, Argentina).

2.2.2. Preparación de matrices poliméricas fibrosas mediante electrohilado de soluciones

Las soluciones de PCL (se prepararon con concentraciones comprendidas entre 17 y 25 % p/p a partir de la disolución de *pellets* de PCL en mezclas de solventes de DCM:MeOH y CLF:MeOH, con diferentes relaciones de volumen.

Cada solución se colocó en una jeringa de polipropileno de 10 ml, conectada a través de un tubo de poliamida a una aguja de acero inoxidable 316 de punta roma de 90° (gauge 18, 1,27 mm de diámetro externo y 0,838 mm de diámetro interno), utilizada como boquilla. La velocidad de flujo se

controló a través de una bomba de infusión (Activa A22 ADOX S.A., Ituzaingó, Argentina). Se utilizó una fuente de alta tensión (ES30P, Gamma High Voltage Research Inc., Ormond Beach, FL, USA) para cargar la solución polimérica, conectando el electrodo de polaridad positiva a la boquilla y empleando una placa colectora de aluminio puesta a tierra. Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente 23°C y humedad relativa inferior a 50 %, dentro de una cámara acrílica con sistema de ventilación.

Finalmente, las matrices electrohiladas se secaron bajo vacío a temperatura ambiente, a fin de eliminar el solvente residual y luego se mantuvieron en desecador hasta su utilización.

Las condiciones de procesamiento empleadas se detallan en la Tabla 2.1. La recolección de material electrohilado se llevó a cabo durante el tiempo necesario para conseguir matrices de 10 µm de espesor. Este tiempo se determinó en base a la experiencia adquirida y a las pruebas realizadas.

Tabla 2.1. Condiciones experimentales usadas para obtener membranas electrohiladas de PCL (*T*: tensión aplicada, Φ : velocidad de infusión, *d*: distancia boquilla-colector)

Muestra	Conc. PCL (% p/p)	Mezcla de solventes (v:v)	<i>T</i> (kV)	Φ (mL.h ⁻¹)	<i>d</i> (cm)
M1	17	5:1 ^a	15	10	18
M2	17	1:1 ^b	17	0.8	12
M3	17	1:1 ^b	17	0.8	11
M4	20	5:1 ^a	11.6	18	15
M5	25	5:1 ^a	7.7	8	9

^a DCM:MeOH

^b DCM:DMF

2.3. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de las matrices poliméricas porosas resulta de vital importancia para comprender su estructura y comportamiento. En el caso de sistemas poliméricos empleados como matrices en ingeniería de tejidos, es preciso conocer características relacionadas con su micro- y nano-estructura, tales como porosidad, tamaños y distribución de poros, dado que

afectan de manera directa la migración y adhesión celular, como así también el intercambio de fluidos y nutrientes fundamentales para la supervivencia, proliferación y diferenciación celular.

2.4. Análisis de la microestructura de las matrices poliméricas

2.4.1. Análisis microestructural mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las matrices electrohiladas se observaron mediante microscopía electrónica a barrido (SEM) utilizando un equipo JEOL JSM6460 LV (Peabody, MA, USA). Las micrografías obtenidas a distinta magnificación se analizaron y procesaron por distintas técnicas.

Las muestras se colocaron en un portamuestra de aluminio utilizando cinta adhesiva bifaz, se recubrió la superficie de las mismas por deposición con oro en una cámara de vacío a 500 mTorr, y finalmente se analizaron a partir de un haz de electrones acelerados por una diferencia de potencial de 15 kV.

Las micrografías SEM se analizaron a fin de obtener información relevante respecto de la micro- y nanoestructura. Se determinó la distribución de diámetros de fibras y diámetro medio de fibra mediante el procesamiento con el software Image-Pro Plus. Se determinó además la porosidad mediante aplicación de un algoritmo de análisis de micrografías SEM.

2.4.2. Determinación del ángulo de contacto

La caracterización de la hidrofiliicidad de la superficie de las matrices se llevó a cabo mediante mediciones de ángulo de contacto estático empleando un goniómetro (modelo 250, ramé-hart instrument Co., Succasunna, NJ, USA). Las gotas de 5 μ l de vaselina líquida medicinal o agua destilada se colocaron en el centro de la superficie de la muestra empleando una microjeringa ubicada verticalmente hacia abajo. Las imágenes de las gotas (tomadas con resolución 640 x 480 pixels, 256 tonos de gris) se adquirieron con una cámara CCD, después de ajustar el contraste, magnificación y foco, y después de un período de espera inicial de 10 segundos. Se tomaron seis imágenes cada 20

segundos. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (23 °C). Los valores de los ángulo de contacto se midieron con el software Dropimage Advanced v2.4.

2.5. Determinación de la porosidad de matrices poliméricas micro/nanofibrosas

Las mediciones de porosidad de las matrices micro/nanofibrosas se efectuaron a través de un conjunto de técnicas que incluyen medición gravimétrica, método de intrusión espontánea de líquidos, análisis de micrografías SEM y porosimetría de extrusión de líquidos.

Los estudios de caracterización de las matrices se realizaron en muestras circulares de 10 mm de diámetro, que se cortaron con troquel.

2.5.1. Medición gravimétrica (GM)

La determinación de porosidad por medición gravimétrica es una alternativa útil cuando no se cuenta con la disponibilidad de equipos más sofisticados. Las muestras se deben preparar cuidadosamente y se requiere una determinación precisa de las dimensiones de la muestra para lograr una buena exactitud. La porosidad de las matrices electrohiladas se determinó mediante la ecuación 2.1:

$$\text{---} \tag{2.1}$$

donde ρ_s es la densidad de la matriz muestra, calculada como el cociente entre su masa y volumen. El volumen se determinó a partir del espesor y diámetro de la muestra, medidos con un microcalibre digital. La densidad de PCL es de $\rho_{PCL} = 1,145 \text{ g.cm}^{-3}$.

2.5.2. Método de intrusión espontánea de líquidos (LIM)

La porosidad de las matrices fibrosas se midió también utilizando el método de intrusión de líquidos. Las muestras se pesaron y posteriormente se sumergieron en un vaso de precipitado con vaselina líquida durante 12 h a temperatura ambiente. Se aplicó agitación magnética, para permitir que el líquido ingrese en los poros de la muestra. Posteriormente, la superficie de las muestras se secó cuidadosamente a fin de eliminar la vaselina en exceso. Las mediciones se realizaron en cinco muestras de cada tipo de membrana. Finalmente, la porosidad se calculó como se indica en la ecuación 2.2.

$$\text{---} \quad (2.2)$$

donde V_v es el volumen de vaselina y se corresponde con el volumen total de poros de la muestra, calculado como el cociente entre el cambio de masa luego de la intrusión y la densidad de la vaselina ($\rho_v = 0,9 \text{ g.cm}^{-3}$). V_{PCL} corresponde al volumen de PCL, calculado como el cociente entre la masa de la matriz seca antes de la intrusión del líquido y la densidad de PCL (ρ_{PCL}).

2.5.3. Análisis de micrografías SEM

Las micrografías SEM de las membranas micro/nanofibrosas se procesaron mediante el software Image Pro-Plus, a fin de determinar la distribución de diámetro de fibras y diámetro medio de fibra. Para ello, se realizaron manualmente mediciones de fibras al azar de distintas muestras de las matrices obtenidas, a razón de 100 mediciones por cada imagen para obtener un volumen de información estadística relevante.

Posteriormente, se determinó el área efectiva o el área total ocupada por las fibras por centímetro cúbico por unidad de masa (gramo) de muestra de polímero, aplicando las ecuaciones que se detallan a continuación.

En primer, lugar se determinó el área total A_i ocupada por las fibras correspondientes a cada diámetro D_i :

$$\text{---} \tag{2.3}$$

donde f_i corresponde a la fracción de fibras de diámetro D_i . La masa total ocupada por fibras de diámetro D_i por unidad de longitud, M_i , se determinó considerando la densidad del polímero (ρ) como:

$$\tag{2.4}$$

Luego, la longitud efectiva de las fibras de diámetro D_i por gramo de muestra, L_i , como:

$$\text{---} \tag{2.5}$$

Finalmente, el área efectiva total por gramo de muestra A_{me} se calculó como:

$$\tag{2.6}$$

El área efectiva por unidad de volumen como:

$$\tag{2.7}$$

Y el área total efectiva multiplicando por el volumen de muestra (V) como:

$$\tag{2.8}$$

De acuerdo al análisis realizado previamente, el área libre se calculó como la diferencia entre el área total ocupada por las fibras (A_T) y el área total

ocupada por la muestra (A_S). Luego, la porosidad se calculó como se muestra en la ecuación 2.9.

$$\text{---} \quad (2.9)$$

2.5.4. Porosimetría de extrusión de líquidos (LEP)

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, la porosimetría LEP es una técnica que presenta importantes ventajas para el análisis de estructuras porosas. La Fig. 2.2. muestra los tipos de poros que pueden presentarse en materiales porosos. La técnica de LEP permite la medición del volumen y distribución de tamaño de poros pasantes sin emplear mercurio, y evitando el uso de presiones elevadas que en el caso de materiales poliméricos puedan distorsionar la estructura de los poros.

Las mediciones requieren de una adecuada selección de parámetros propios de la técnica y del conocimiento de propiedades del sistema, tales como tensión superficial, densidad del líquido y ángulo de contacto polímero/líquido [13, 14].

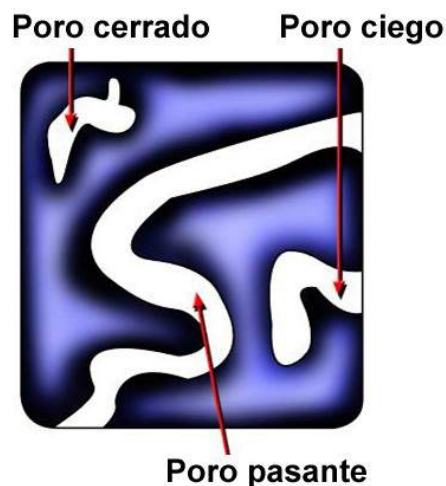


Fig. 2.2. Tipos de poros en materiales porosos

La técnica de LEP proporciona una descripción completa de la morfología de estructuras porosas, y resulta una técnica apropiada para el estudio de materiales poliméricos fibrosos. Los poros de la muestra se llenan espontáneamente con un líquido que posteriormente se desplaza mediante la aplicación de una presión de gas no reactivo. La Fig. 2.3 muestra un esquema de la cámara de muestra y colocación de la muestra. La diferencia de presión requerida para desplazar el líquido se relaciona inversamente con el diámetro de poro mediante la ecuación de Washburn (ecuación 2.10), es decir que el incremento de presión conduce al desplazamiento del líquido de los poros de mayor diámetro antes que los de menor tamaño:

$$\text{-----} \quad (2.10)$$

donde p es la diferencia de presión a través de la longitud del poro, D es el diámetro de poro, γ es la tensión superficial del líquido utilizado, y θ es el ángulo de contacto del líquido con la superficie de la muestra.

La muestra se coloca en la cámara de muestra sobre una membrana porosa que actúa de barrera limitante, de tal manera que el mayor de los poros de dicha membrana es menor al poro más pequeño de interés en la muestra. Esto evita que el gas se escape, debido a que la presión aplicada no es suficiente para desplazar el líquido de esta membrana. El volumen del líquido que fluye fuera de la membrana se recoge y se pesa en una balanza analítica. El volumen total corresponde al volumen de poro de la muestra.

Mediante esta técnica no es posible la medición de la contribución de los poros ciegos o cerrados, aunque la cantidad de poros ciegos o cerrados en las membranas electrohiladas de interés es prácticamente nula. Las mediciones de tamaño de poro y su distribución, se realizaron con un porosímetro de extrusión de líquidos (LEP Modelo 1100-A-X, Porous Materials, Inc., Ithaca, NY, USA). Las características estructurales se calcularon mediante el software suministrado de Porous Materials Inc. (Ithaca, NY, USA). Las Fig. 2.4 y 2.5 muestran imágenes del equipo empleado y su cámara de extrusión. Vale la pena resaltar que este equipo es único en el país y que el conocimiento para

su operación y puesta en funcionamiento se adquirió durante el curso de esta tesis.

Para realizar los cálculos requeridos, el equipo precisa los valores de densidad del líquido, tensión superficial, ángulo de contacto líquido/muestra, y densidad y el espesor de la muestra. Debido a que el ángulo de contacto del agua en la superficie de PCL es muy elevado (110°), el agua no resulta un líquido adecuado para ingresar espontáneamente en la estructura porosa de las matrices electrohiladas de PCL. Por ese motivo se empleó vaselina líquida como líquido para la saturación de las muestras, dado que posee un ángulo de contacto próximo a cero. La tensión superficial de la vaselina empleada es de 33 dyn.cm^{-1} (medida a 20°C por Drosanto®). La vaselina líquida no hincha, contrae, ni disuelve las membranas de PCL, y posee una baja presión de vapor, lo que resulta importante para evitar la evaporación del líquido durante los ensayos.

Las muestras de matrices electrohiladas de masa y densidad conocida, se colocaron sobre membranas de poli(tetrafluoroetileno) de tipo 11806-047N (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany), utilizadas como membranas limitantes. Éstas son membranas hidrofóbicas, con un tamaño de poro nominal de $0,45 \mu\text{m}$ y 47 mm de diámetro. Por lo tanto y tal como se indicó anteriormente, esto permite efectuar la medición de poros con tamaño superior a $0,45 \mu\text{m}$.

El software del equipo registra el diferencial de presión inicial y la lectura inicial de la balanza, luego el LEP produce un incremento diferencial de la presión del gas de acuerdo al tamaño de paso indicado, registrando los diferenciales de presión de gas y las correspondientes lecturas de la balanza. En los ensayos realizados, la presión inicial se estableció en $0,01 \text{ psi}$ para equilibrar el sistema, mientras que la primera toma de muestra se realizó a una presión de $0,05 \text{ psi}$. La presión diferencial se aumentó en pasos de $0,01 \text{ psi}$ hasta 22 psi . Finalizado el ensayo, el software del equipo efectúa automáticamente todos los cálculos y presenta los resultados. La distribución de volumen de poros pasantes está dada por la función de distribución dada por la ecuación 2.11.

(2.11)

donde V es el volumen de poro acumulado y D es el diámetro de poro. De tal manera que el área bajo la curva de la función de distribución en cualquier rango de diámetro de poro, se corresponde con el volumen de poro de dicho rango. Por lo tanto, la porosidad de la membrana se determina mediante la integración de la función de distribución de poco acumulada en todo el rango de diámetro de poro.

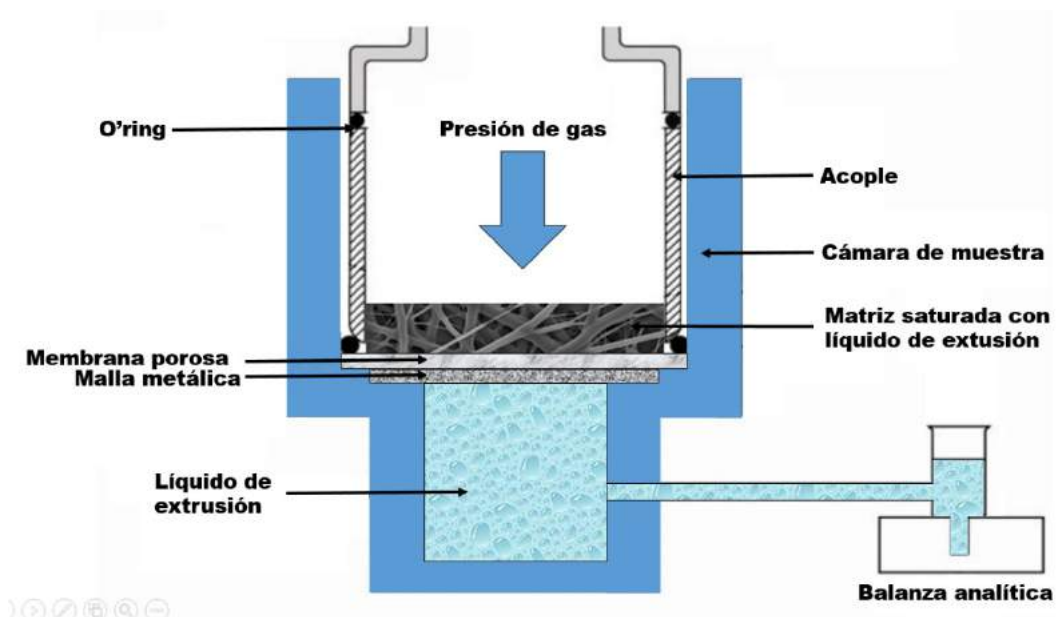


Fig. 2.3. Cámara de muestra y colocación de la muestra para una determinación de LEP.



Fig. 2.4. Porosímetro de extrusión de líquidos (LEP Modelo 1100-A-X, Porous Materials, Inc.).



Fig. 2.5. Porosímetro de extrusión de líquidos y cámara de extrusión.

2.5.5. Análisis estadístico

Los valores de diámetro de fibra y porosidad medidos, se expresan como valor medio \pm desviación estándar (d.e.). Las diferencias estadísticas entre el diámetro de fibra de las matrices de su cara al aire respecto de su cara en contacto con el colector de aluminio, se determinaron mediante la aplicación de test de *Student* con un intervalo de confianza de 99%. Para cada muestra, se desarrolló un análisis de varianza a fin de determinar diferencias significativas

existentes entre los valores de porosidad medidos a partir de las diferentes técnicas empleadas con respecto a los obtenidos mediante LEP. Se llevó a cabo una prueba de rangos de *Tukey* a un nivel de significación del 95%, mediante el uso de un software para el análisis estadístico (SPSS Inc., versión 11.5). Los valores medios de porosidad se analizaron utilizando *Q-test* a un nivel de significación del 90%.

2.6. Estudio de la porosidad de matrices poliméricas electrohiladas

2.6.1. Preparación de matrices y caracterización morfológica mediante SEM

En el proceso de electrohilado, la morfología y diámetro de las micro/nanofibras producidas están determinadas, como se mencionó detalladamente en la sección 1.5.1, por los parámetros de la solución (naturaleza del polímero, concentración, naturaleza del solvente, conductividad, y tensión superficial), parámetros de procesamiento (velocidad de flujo de la solución, tensión aplicada y distancia boquilla-colector), y por parámetros ambientales (temperatura y humedad) [28, 29]. Las condiciones de procesamiento empleadas para la preparación de las matrices fibrosas, se seleccionaron luego de una serie de ensayos experimentales previos, de modo que aseguran obtener fibras uniformes y continuas [30]. Se exploraron diferentes concentraciones de polímeros, sistemas de solventes, porcentajes de mezclas y parámetros de electrohilado en un amplio rango a fin de asegurar la formación de un cono de Taylor estable, así como la formación de matrices con diferentes diámetros de fibras. Se prepararon finalmente cinco tipos de matrices micro /nanofibras utilizando las condiciones descriptas en la Tabla 2.1.

El análisis SEM permitió estudiar la morfología de las matrices electrohiladas. Se observaron y analizaron tanto la cara de las muestras expuesta al aire, como así también la cara en contacto con el colector de aluminio, no encontrándose diferencias significativas en la morfología entre ambas caras. Las superficies de las muestras de PCL mostraron una típica estructura electrohilada de fibras orientadas al azar, exhibiendo una distribución

de fibras altamente anisotrópica, con macroporos abiertos e interconectados, y una distribución de poros a través de la estructura que evidencia muestras de alta porosidad, tal como se muestra en la Fig. 2.6.

Por otro lado, en la Fig. 2.7. se observa la distribución de frecuencias de diámetro de las fibras, mientras que el diámetro medio de fibras determinado (w), que se encuentra en el rango entre 0.4 y 7 μm , como se resume en la Tabla 2.2. El diámetro de fibras exhibió una distribución unimodal en todas las matrices obtenidas.

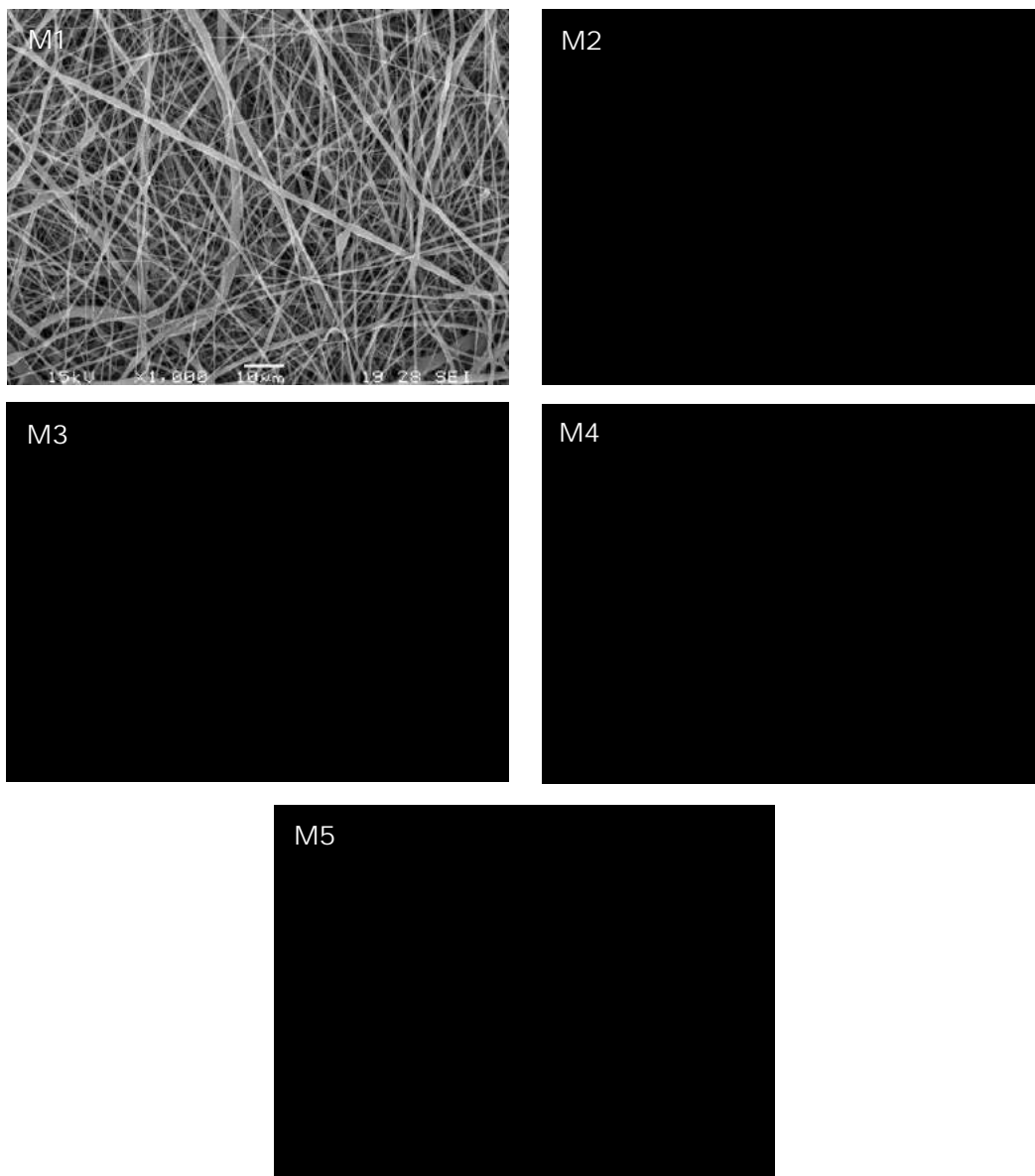


Fig. 2.6. Micrografías SEM de las matrices electrohiladas de PCL (magnificación 1000X).

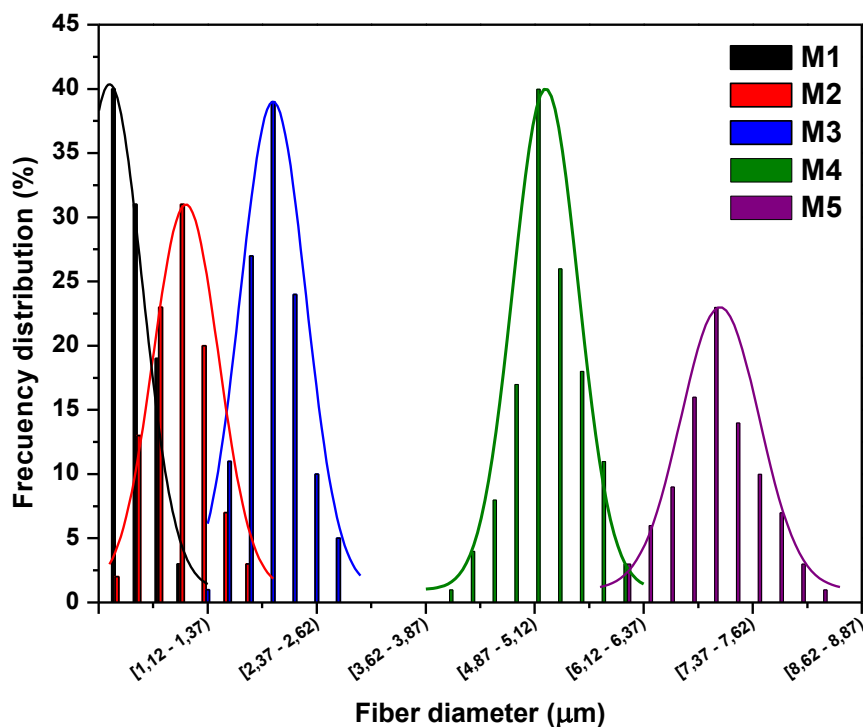


Fig. 2.7. Distribución de diámetro de fibras de las matrices electrohiladas de PCL.

2.6.2. Análisis de la distribución de tamaño de poro mediante LEP

Mediante la técnica de LEP se llevó a cabo la medición de tamaño de poro de las matrices de manera exitosa. La Fig 2.8. muestra una curva representativa obtenida a partir de una medición por LEP, en este caso de la muestra M1. El volumen de poro acumulado correspondiente a los poros pasantes, se grafica como una función de la presión diferencial aplicada. Un valor máximo de presión de 22 psi se aplicó a fin de completar la extrusión total del líquido a partir de la muestra M1, que es la muestra con el menor diámetro de fibra (0.39 μm). La baja presión aplicada durante todo el procedimiento de

medición asegura que las muestras no se compriman o distorsionen durante la aplicación de los diferenciales de presión.

La Fig 2.9. muestra la función de distribución de volumen de poro de los datos mostrados en la Fig 2.8., mientras que en la Fig 2.10. se observa la relación entre el diámetro de poro (estimado empíricamente a partir de los datos de la Fig 2.9.) y el diámetro medio de fibra. Los diámetros medios de poro obtenido mediante LEP se muestran en la Tabla 2.2. La distribución de tamaño de poro no depende del diámetro medio de fibra, resultando en una distribución unimodal en todos los casos medidos. LEP permitió obtener una excelente resolución de picos, además de la determinación completa de todo el rango de poros de interés. Fue posible discernir el efecto del diámetro de fibra en el tamaño de poro y su distribución. Los resultados indicaron que el incremento en el diámetro de fibra condujo a un aumento de diámetro de poro, tal como fue informado previamente por Sampson [9].

Se ensayaron además, muestras preparadas a partir del apilamiento multicapa de matrices electrohiladas. En este caso se produjo una disminución del diámetro de poro, lo que concuerda con los datos reportados previamente por Li *et al.* [12], quien demostró que el tamaño y la distribución de poros depende del tamaño y cantidad de las fibras. Por lo que el aumento en la masa de matriz condujo a una disminución del tamaño de poro, cambiando la distribución hacia valores más bajos.

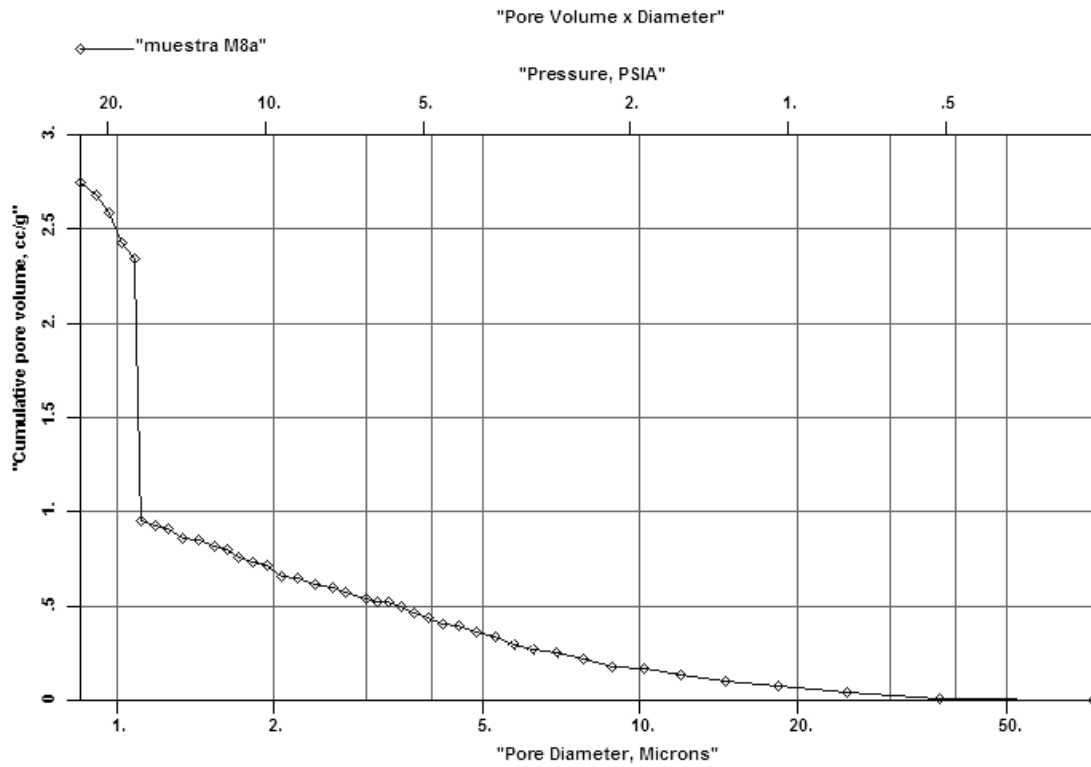


Fig. 2.8. Curva típica de volumen de poro acumulado en función del diámetro de poro, obtenida por LEP. El tamaño de poro es calculado por el porosímetro registrando el tamaño de poro decreciente, a medida que se incrementa el diferencial de presión.

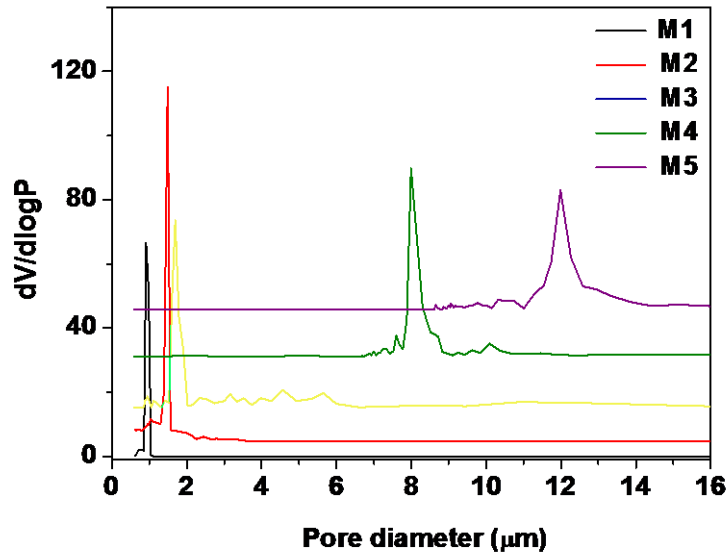


Fig. 2.9. Función de distribución de volumen de poro pasante (f_V) como una función del diámetro de poro de las matrices electrohiladas de PCL medida mediante LEP.

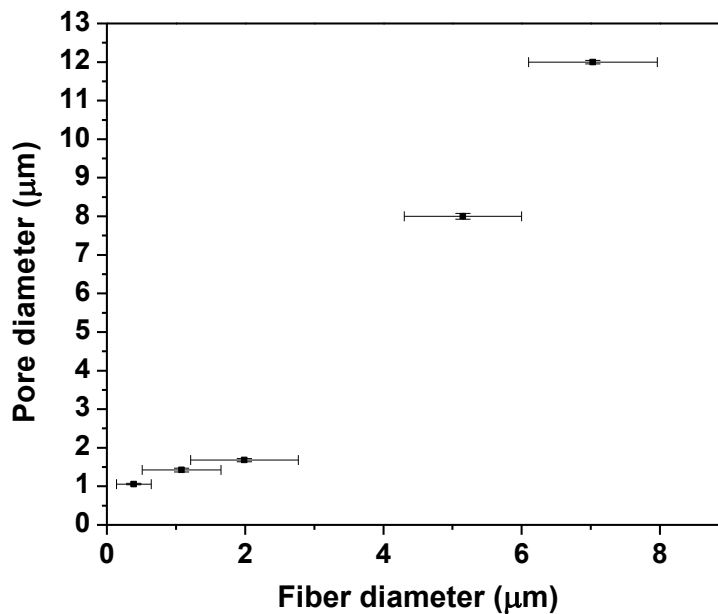


Fig. 2.10. Diámetro de poro d_{LEP} (medido mediante LEP) como una función del diámetro de fibra (determinado mediante análisis de imágenes SEM).

Tabla 2.2. Características de matrices electrohiladas de PCL

Muestra	$h \pm \text{d.e.}$ (μm) ^a	$w \pm \text{d.e.}$ (μm) ^b	$d_{\text{LEP}} \pm \text{d.e.}$ (μm) ^c	$d_s \pm \text{d.e.}$ (μm) ^d	$\bar{\beta}$ (g m^{-2}) ^e
M1	9.6 ± 0.4	0.39 ± 0.25	1.06 ± 0.05	0.12 ± 0.01	19.10
M2	9.3 ± 0.5	1.08 ± 0.57	1.42 ± 0.05	0.73 ± 0.02	16.55
M3	10.3 ± 0.7	1.99 ± 0.78	1.68 ± 0.04	1.60 ± 0.03	24.19
M4	10.7 ± 0.1	5.15 ± 0.85	8.09 ± 0.07	6.67 ± 0.22	13.85
M5	9.76 ± 0.8	7.03 ± 0.93	12.01 ± 0.04	10.04 ± 0.05	16.02

^a Espesor medio medido con microcalibre digital

^b Diámetro medio de fibra determinado mediante análisis de imágenes SEM

^c Diámetro medio de poro determinado por LEP

^d Diámetro medio de poro establecido a partir del modelo de Sampson

^e Densidad de área determinada como el cociente entre la masa de la muestra y su área.

2.6.3. Análisis de la porosidad de matrices poliméricas

La porosidad de un material se define como el volumen libre en relación con el volumen total. En el caso de las matrices electrohiladas, los valores de porosidad típicos se encuentran en el rango de 70 a 95 %. A fin de determinar los valores de porosidad de las matrices electrohiladas, se emplearon cuatro técnicas diferentes: mediciones gravimétricas, intrusión de líquidos, análisis de imágenes SEM, y porosimetría de extrusión de líquidos. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 2.11., donde se presentan los valores de porosidad medidos a partir de las cuatro técnicas mencionadas, para matrices con diferente diámetro medio de fibra, y la variabilidad en las mediciones realizadas por quintuplicado mediante barras de error, respecto del valor de porosidad medido.

Las determinaciones gravimétricas permitieron estimar valores de porosidad aparente P_{GM} , mediante la relación teórica entre la porosidad y la densidad, determinada a partir de la ecuación 2.1. En esta técnica, la sobreestimación del volumen de la muestra es inevitable, debido a que éste se

calcula a partir de la forma exterior de la matriz, sin considerar la concavidad y convexidad de la superficie fibrosa. La sobreestimación del volumen conlleva a la subestimación de los valores P_{GM} . Los valores de P_{GM} resultaron los menores valores de porosidad en todas las muestras analizadas. Además, los valores de P_{GM} son dependientes de la composición de la muestra y de la técnica de medición. Así lo reportaron Kwon *et al.* en sus mediciones de porosidad de copoliésteres electrohilados con diámetro medio de fibra cercanos a los obtenidos en las mediciones realizadas en las matrices de PCL en estudio (0,3; 1,2 y 7,0 μm). Además indicaron que las porosidades medidas mediante porosimetría de intrusión de mercurio resultaron menores que las calculadas mediante el método gravimétrico, P_{GM} [31].

El método de intrusión de líquido permite obtener el valor de la porosidad mediante la determinación del volumen total de poros, medido indirectamente por la infiltración de un líquido de densidad conocida. Se empleó vaselina líquida, dado que ingresa espontáneamente en la estructura porosa de PCL (ángulo de contacto igual a cero), sin efectos de hinchamiento. La manipulación de las muestras introduce algunas dificultades asociadas con el procedimiento requerido para remover el líquido superficial. Por lo tanto, la técnica LIM podría subestimar los valores de porosidad, debido a la eliminación de parte de la vaselina durante la limpieza de la superficie de la muestra.

El análisis de imágenes SEM complementa estas mediciones, permitiendo la estimación de valores de porosidad a partir de micrografías SEM bidimensionales. Los valores P_{SEM} resultaron ligeramente superiores a los P_{LEP} , y no mostraron una variación significativa respecto de estos valores. Aunque este método permite analizar sólo los poros superficiales sin considerar a las matrices con alta densidad de fibra, sorprendentemente proporcionó valores de porosidad cercanos a los obtenidos por LEP.

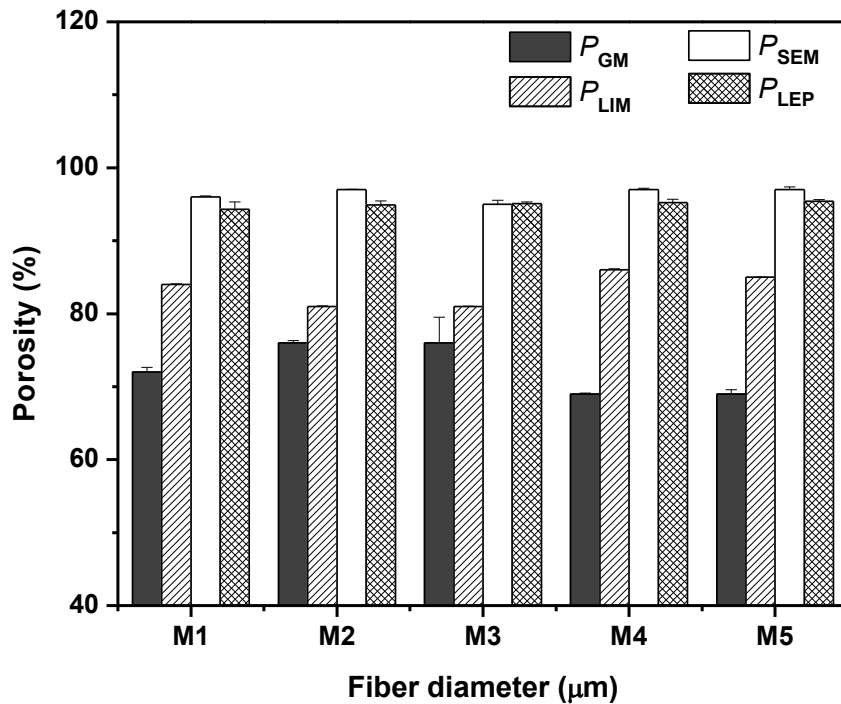


Fig. 2.11. Porosidad de las matrices electrohiladas de PCL determinadas mediante diferentes técnicas para muestras con diferente diámetro medio de fibra.

2.6.4. Modelado del tamaño de poro de matrices electrohiladas

Los tamaños de poro de las matrices electrohiladas pueden estimarse mediante el uso de diferentes modelos matemáticos teóricos y empíricos reportados en la literatura. En esta tesis, se aplicó un modelo teórico desarrollado por Sampson [9] y más tarde ampliado por Eichhorn y Sampson [10], para calcular los diámetros medios de poro. Este fue el primer trabajo que reportó una comparación entre los datos obtenidos mediante LEP y un modelo teórico. La mayoría de los estudios que se encuentran en la literatura reportan relaciones entre porosimetría de intrusión de mercurio y modelos matemáticos.

El modelo de Sampson calcula un diámetro de poro medio en un plano para redes de fibra estocásticas. Por lo tanto y para aplicación de este modelo, las matrices electrohiladas se consideran como capas bidimensionales apiladas formadas por barras rectas distribuidas de manera aleatoria que representan

las nano/microfibras. Se considera además, que las fibras poseen sección transversal circular uniforme. El diámetro medio de poro (o radio) se calcula como una función del diámetro medio de fibra (w) y de la porosidad media (P).

La distribución de radio de poros puede aproximarse por medio de una distribución gamma (Γ). Para una red aleatoria de dos dimensiones con porosidades mayores que aproximadamente 0,3; el radio medio de poro puede aproximarse como una función de la porosidad y el diámetro de la fibra, como:

$$\text{---} \text{---} \text{---} \quad W \quad (2.12)$$

La distribución gamma de radio de poro tiene dos parámetros (k y b) que caracterizan a la distribución, de modo que r_{2D} medio = k/b , varianza $\sigma^2(r) = k/b^2$, y coeficiente de variación $CV(r_{2D}) = k^{(-1/2)}$. Este coeficiente se considera como constante, y su valor para redes aleatorias es $(16 - \pi^2)^{1/2} / \pi$. Sampson [9] derivó la función de densidad de probabilidad para radios de poro en una red estocástica plana casi-isotrópica por la superposición de n capas de dos dimensiones como:

$$\text{---} \text{---} \text{---} \quad (2.13)$$

donde el número de capas n está dado por:

$$\text{---} \quad (2.14)$$

β es la densidad aérea media y δ es la densidad lineal de las fibras (sección transversal de la fibra multiplicada por la densidad de las fibras).

El radio medio de poro para una estructura formada por n capas se determina a través de la siguiente integral

(2.15)

Para cada muestra, el radio medio de poro (y diámetro d_s) se calculó utilizando la ecuación 2.15, empleando el valor de porosidad obtenido por LEP y el diámetro medio de fibra (w) determinado a partir de análisis SEM, asumiendo un diámetro de fibra monodisperso. El valor de porosidad media ($P \sim 0,87$) fue obtenido, promediando los valores de porosidad calculados mediante LEP, LIM, GM y SEM. Los cálculos se realizaron mediante el software Mathcad versión 14.0.

La Tabla 2.2 muestra los valores de densidad de área media ($\bar{\beta}$) de las matrices electrohiladas. Existen reportes de estas propiedades en matrices nanofibrasas [10]. Los valores de β se determinaron en el rango de 16 a 24 g.m⁻². La Fig. 2.12 muestra la relación entre el diámetro medio de poro determinado a partir del modelo de Sampson y los valores empíricos determinados mediante LEP como una función del diámetro de fibra, considerando una porosidad de $P = 0.87$. Los diámetros de poro se muestran también en la Tabla 2.2. Como se indica en la Fig 2.12., los tamaños de poro determinados por el modelo se corresponden con los datos experimentales obtenidos mediante LEP, para matrices con diámetro de fibra superior al micrón. La mayor desviación se encontró en la muestra con el diámetro de fibra menor (M1), para la cual el tamaño de poro medio obtenido por LEP fue de 1,06 μm a diferencia del determinado por el modelo de 0,12 μm .

Pham *et al.* [19] encontraron también que el tamaño de poro determinado por el modelo de Sampson era más pequeño que los medidos experimentalmente mediante porosimetría de intrusión de mercurio. Por el contrario, Szentivanyi *et al.* observaron que el modelo de Sampson sobreestima los tamaños de poros en todo el rango de diámetro de fibras, al comparar los resultados obtenidos por el modelo con los resultantes de porosimetría de intrusión de mercurio [32]. Bagherzadeh *et al.* [33] desarrollaron un modelo teórico para la caracterización de las estructuras porosas de matrices nanofibrasas electrohiladas combinando enfoques estocásticos y probabilidad estereológicas. Determinando que el diámetro de

fibra, la porosidad y el espesor de las muestras se ven fuertemente influenciadas por parámetros morfológicos y estructurales de la red. Encontraron que los valores pronosticados por el modelo de Sampson se hallaron muy lejos de los obtenidos experimentalmente y de los determinados mediante la aplicación de su modelo teórico.

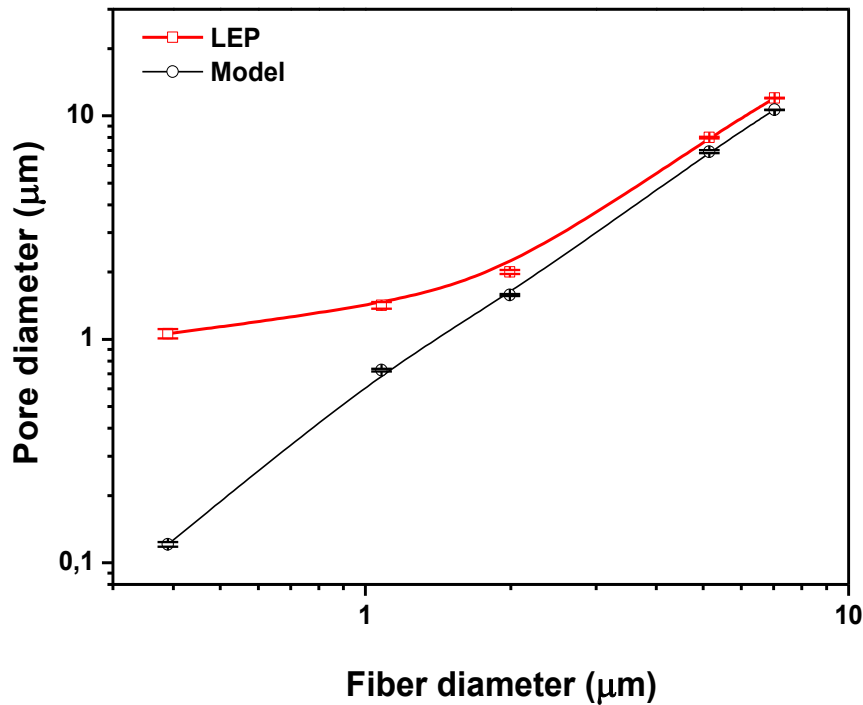


Fig.2.12. Relación entre diámetro de poro y diámetro de fibra, comparando mediciones de LEP (rojo) y resultados del modelo de Sampson (negro).

Un aspecto muy importante a tener en cuenta es que, la colección de fibras sostenida en el tiempo durante el proceso de electrohilado aumenta el espesor de la matriz porosa y la densidad de área de la matriz, produciendo en consecuencia una disminución en el diámetro medio de poro. Por lo tanto, incluso para el mismo polímero y diámetro de la fibra, no es posible establecer una comparación directa de tamaños de poro reportados en la literatura para una matriz particular, sin considerar la densidad de área. Como un ejemplo de esto, la muestra con diámetro de la fibra mayor (7,03 µm) exhibió un diámetro de poro de 12 µm medido por LEP y 10 µm a partir de la aplicación del modelo.

Sin embargo, para matrices con diámetro medio de fibra de 2 μm se reportó un tamaño de poro medio de aproximadamente el mismo valor (10,5 μm) [19].

Aunque existe controversia con respecto al tamaño de poro óptimo para lograr una infiltración celular eficiente y homogénea, existe un consenso de que al menos resultan necesarios tamaños de poro desde unas decenas a unos pocos cientos de micrómetros para conseguir la migración, proliferación y diferenciación apropiada de determinadas células en matrices tridimensionales [34, 35]. Dado que los poros formados en las matrices electrohiladas resultan una desventaja para aplicaciones de ingeniería de tejidos, se investiga la formación de sistemas electrohilados con mayor tamaño de poro [35].

2.7. Conclusiones parciales

Se obtuvieron diversas matrices fibrosas de poli(ϵ -caprolactona) mediante tecnología de electrohilado de soluciones a través de la selección apropiada de condiciones experimentales. Las matrices exhibieron fibras uniformes, orientadas al azar, con diámetros medios de fibra en el intervalo de 0,4 a 7 μm . Las características estructurales de las matrices evidenciaron en todos los casos distribuciones de tamaño de poro de tipo unimodal. La porosidad se determinó mediante diferentes técnicas experimentales, sin encontrar diferencias significativas asociadas a los procedimientos empleados.

La porosimetría LEP demostró ser una técnica con alto potencial para el estudio de las características de porosidad de las matrices electrohiladas en comparación con otras técnicas de análisis no instrumental. Aunque la porosimetría LEP requiere de un ajuste preciso de los parámetros experimentales, de la realización de ensayos que insumen un tiempo prolongado, y de la selección adecuada del líquido de extrusión, resulta una técnica adecuada para la caracterización estructural de matrices micro y nanofibras. La aplicación de bajas presiones durante el proceso de medición resultó otra ventaja al evitar la deformación de la estructura porosa y la modificación del tamaño de poro. Finalmente, la porosimetría LEP podría resultar una técnica muy útil para el estudio de otros tipos de matrices electrohiladas como por ejemplo las matrices con tamaño de poro incrementado.

2.8. Referencias

- [1] B.G. Chung, L. Kang, A. Khademhosseini, "Micro- and nanoscale technologies for tissue engineering and drug discovery applications". *Expert Opin., Drug Discov.*, 2, 1 - 16, 2007.
- [2] X. Wang, B. Ding, B. Li, "Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering". *Mater. Today*, 16, 229 - 241, 2013.
- [3] E.R. Kenawy, F.I. Abdel-Hay, M.H. El-Newehy, G.E. Wnek, "Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems". *Mater. Chem. Phys.*, 113, 293 - 302, 2009.
- [4] T.J. Sill, H.A. von Recum, "Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering". *Biomaterials*, 29, 1989 - 2006, 2008.
- [5] S. Agarwal, J.H. Wendorff, A. Greiner, "Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications". *Adv. Mater.*, 21, 3343 - 3351, 2009.
- [6] M. Zamani, M.P. Prabhakaran, S. Ramakrishna, "Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials". *Int. J. Nanomedicine*, 8, 2997 - 3017, 2013.
- [7] R.L. Dahlin, F. Kurtis Kasper, A.G. Mikos, "Polymeric nanofibers in tissue engineering". *Tissue Eng. B*, 17, 349 - 364, 2011.
- [8] S. Agarwal, J.H. Wendorff, A. Greiner, "Use of electrospinning technique for biomedical applications". *Polymers*, 49, 5603 - 5621, 2008.
- [9] W. Sampson, "A multiplanar model for the pore radius distribution in isotropic near-planar stochastic fibre networks". *J. Mater. Sci.*, 38, 1617 - 1622, 2003.
- [10] S.J. Eichhorn, W.W. Sampson, "Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies". *J. R. Soc. Interface*, 2, 309 - 318, 2005.
- [11] P.A. Webb, "An Introduction to the Physical Characterization of Materials by Mercury Intrusion Porosimetry with Emphasis on Reduction and Presentation of Experimental Data". *Micromeritics Instrument Corp*, 2001.
- [12] D. Li, M.W. Frey, Y.L. Joo, "Characterization of nanofibrous membranes with capillary flow porometry". *J. Membr. Biol.*, 286, 104 - 114, 2006.
- [13] A. Jena, K. Gupta, "Characterization of pore structure of filtration media". *Fluid Part. Sep. J.*, 4, 227 - 241, 2002.
- [14] A. Jena, K. Gupta, "Liquid extrusion technique for pore structure evaluation of nonwovens". *Int. Nonwovens J.*, 12(3), 45 - 53, 2003.
- [15] S.T. Ho, D.W. Huttmacher, "A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds". *Biomaterials*, 27, 1362 - 1376, 2006.
- [16] R. Bagherzadeh, M. Latifi, S.S. Najari, M.A. Tehran, L. Kong, "Three-dimensional pore structure analysis of nano/microfibrous scaffolds using confocal laser scanning microscopy". *J. Biomed. Mater. Res.*, 101 A, 765 - 774, 2013.
- [17] M. Ziabari, V. Mottaghitlab, A.K. Haghi, "Evaluation of electrospun

- nanofiber pore structure parameters". *Korean J. Chem. Eng.*, 25, 923 - 932, 2008.
- [18] D. Semnaani, L. Ghasemi-Mobarakeh, M. Morshed, M.H. Nasr-Esfahani, "A novel method for the determination of cell infiltration into nanofiber scaffolds using image analysis for tissue engineering applications". *J. Appl. Polym. Sci.*, 111, 317 - 322, 2009.
- [19] Q.P. Pham, U. Sharma, A.G. Mikos, "Electrospun poly(ϵ -caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration". *Biomacromolecules*, 7, 2796 - 2805, 2006.
- [20] A. Jena, K. Gupta,, "Pore size distribution in porous materials", de *Proceedings of the International Conference Filtration 99*, Chicago, Noviembre 1999.
- [21] A. Jena, K. Gupta, "Pore volume of nanofiber nonwovens". *Int. Nonwovens J.*, 14(2), 25 - 30, 2005.
- [22] L.V. Thomas, P.D. Nair, "(Citric acid-co-polycaprolactone triol) polyester: a biodegradable elastomer for soft tissue engineering". *Biomatter*, 1, 81 - 90, 2011.
- [23] C. Pitt, "Poly- ϵ -caprolactone and its copolymers", de *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, M. Dekker, Ed., New York, 1990, 71 - 120.
- [24] A. C. Albertsson, I. K. Varma, "Aliphatic polyesters: synthesis, properties and applications". *Adv. Polym. Sci.*, 157, 1 - 40, 2002.
- [25] R. Chandra, R. Rustgi, "Biodegradable polymers". *Progress in Polymer Science*, 32, 762 - 798, 2002.
- [26] L.S. Nair, C.T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials". *Progress in Polymer Science*, 32, 762 - 798, 2007.
- [27] M. Okada, "Chemical syntheses of biodegradable polymers". *Progress in Polymer Science*, 27, 87 - 133, 2002.
- [28] A. Greiner, J.H. Wendorff, "Electrospinning: a fascinating method for the preparation". *Angew. Chem. Int.*, 46, 2 - 36, 2007.
- [29] D.H. Renecker, I. Chun, "Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning". *J. Nanotechnol.*, 7, 216 - 223, 1996.
- [30] P.R. Cortez Tornello, G.E. Feresin, A. Tapia, I.G. Veiga, Â.M. Moraes, G.A. Abraham, T.R. Cuadrado, "Dispersion and release of embelin from electrospun biodegradable, polymeric, membranes". *Polym. J.*, 44, 1105 - 1111, 2012.
- [31] I.K. Kwon, S. Kidoaki, T. Matsuda, "Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential". *Biomaterials*, 26, 3929 - 3939, 2005.
- [32] A. Szentivanyi, C.T. Chakradeo, H. Zernetsch, B. Glasmacher, "Electropun cellular microenvironments: understanding controlled release and scaffold structure". *Adv. Drug Deliv. Rev*, 63, 209 - 220, 2011.
- [33] R. Bagherzadeh, S.S. Najar, M. Latifi, M.A. Tehran, L. Kong, "A theoretical analysis and prediction of pore size and pore size distribution in electrospun multilayer nanofibrous materials". *J. Biomed. Mater. Res.*,

101A, 2107 - 2117, 2013.

- [34] S.H. Oh, I.K. Park, J.M. Kim, J.H. Lee, "In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method". *Biomaterials*, 28, 1664 - 1671, 2007.
- [35] S. Zhong, Y. Zhang, C.T. Lim, "Fabrication of large pores in electrospun nanofibrous scaffolds for cellular infiltration: A review". *Tissue Eng. B*, 18, 77 - 87, 2012.

Capítulo 3

Estudio de la dispersión de embelina en matrices poliméricas

3.1. Introducción

Durante la última década, el uso de polímeros para la administración de agentes terapéuticos en el campo farmacéutico y agrícola se ha incrementado de manera sostenida. La tecnología de liberación controlada ha dejado de ser sólo un elemento útil en la investigación, para tener un impacto clínico significativo. Los avances previstos para la próxima década posicionan a la tecnología de liberación controlada a partir de polímeros biodegradables, como una de las áreas de mayor consecuencia práctica en la terapia médica. Estos polímeros ofrecen grandes ventajas, permitiendo la administración de agentes terapéuticos de manera sistémica o en sitios específicos, sin la necesidad de recuperar el sistema de entrega luego de la terapia [1].

Los agentes terapéuticos incluidos en una forma galénica convencional, se distribuyen indistintamente entre dianas biológicas específicas y otros tejidos anatómicos. Con el fin de obtener una terapia más racional y mejor adaptada, una de las posibilidades más prometedoras es la que utiliza el concepto de vectorización. Entendiendo a la vectorización como la operación tecnológica cuyo objetivo es modular y, en el caso ideal, dirigir un agente terapéutico en el organismo. En farmacología, se conoce como vector a la forma farmacéutica que engloba al agente terapéutico, de tal forma que es la estructura química del vector la responsable de las propiedades del conjunto "vector-agente terapéutico". Así, las propiedades físico-químicas del vector (tamaño, carga, mecanismo de liberación, etc.) son las responsables de, por ejemplo:

- a) las propiedades farmacocinéticas del agente terapéutico (distribución);
- b) mejorar el índice terapéutico, aumentando el efecto terapéutico y/o disminuyendo los efectos indeseables y la toxicidad que provoca el agente;
- c) aumentar la vida media del agente terapéutico protegiendo a los agentes lábiles de su inactivación;
- d) modular la liberación del agente terapéutico en el tiempo [2, 3].

Los sistemas poliméricos deben cumplir con algunas características para su empleo como vectores para administración de agentes terapéuticos. En la Fig. 3.1 se mencionan estas características deseadas.



Fig. 3.1. Características ideales de los sistemas poliméricos para su empleo como vectores de agentes terapéuticos.

Inerte: el sistema polimérico no debe generar reacciones tóxicas en el organismo, incluidas aquellas sustancias que puedan migrar y ocasionar irritación sobre la piel o las mucosas, o generar daños sobre el material genético (genotoxicidad, carcinogenicidad y toxicidad reproductiva).

Biocompatible: el sistema polimérico debe ser aceptado por parte del sistema inmunológico del individuo sin generar reacciones adversas. Entre algunas de

las posibles reacciones del huésped se incluyen, resistencia a la coagulación sanguínea, resistencia a la colonización de bacterias y alteraciones en el proceso de cicatrización [4]

Requerimientos mecánicos: los materiales poliméricos que actúan como vectores para liberación controlada de agentes terapéuticos constituyen sistemas de entrega estables. Algunos mantienen su integridad dentro del organismo durante el tiempo de acción y otros se van degradando conforme se libera el agente.

Alta capacidad de carga y eficiencia de encapsulación: el sistema polimérico vector debe ser capaz de contener una cantidad de agente terapéutico tal que permita mantener durante un período de tiempo prolongado un nivel efectivo de agente en circulación o sitio de acción.

Facilidad para administrar y eliminar: el método de colocación del sistema en el organismo debe ser lo menos invasivo posible a fin de no generar complicaciones adicionales a las que se pretenden tratar. Los sistemas generalmente se preparan a partir de materiales poliméricos biodegradables, biorreabsorbibles, bioerosionables o bioabsorbibles [5].

Biodegradable: material polimérico sólido o dispositivo que se descompone debido a degradación macromolecular con dispersión *in vivo* pero sin eliminación del cuerpo (esta definición excluye la degradación ambiental, por hongos o bacterias). El sistema polimérico puede ser atacado por elementos biológicos de tal manera que la integridad del sistema se afecta generando fragmentos o subproductos de degradación. Estos fragmentos pueden moverse fuera del sitio de acción pero no necesariamente eliminarse del cuerpo.

Biorreabsorbible: material que experimenta una degradación en masa y además se reabsorbe *in vivo* mediante eliminación por rutas metabólicas: filtración de subproductos de degradación o después de la metabolización. La biorreabsorción implica la eliminación total del material extraño inicial y de los

subproductos de degradación (compuestos de bajo peso molecular) sin efectos laterales residuales.

Bioerosionable: material que se degrada en superficie y además se reabsorbe *in vivo*. La bioerosión también implica eliminación total del material.

Bioabsorbible: material que puede disolverse lentamente en los fluidos corporales sin ninguna escisión de la cadena polimérica o disminución del peso molecular. Un polímero bioabsorbible puede ser biorreabsorbible si las macromoléculas dispersadas se eliminan completamente.

Facilidad para fabricación y esterilización: el biomaterial polimérico debe ser de fácil obtención, y debido a que cumple su función en contacto con un medio biológico, debe ser esterilizable para evitar posibles contaminaciones en el sitio de acción.

3.1.1. Matrices micro/nanofibrosas como sistemas de liberación controlada de agentes terapéuticos

Las micro y nanofibras electrohiladas presentan características funcionales de gran atractivo para su uso como vectores para administración de agentes terapéuticos. Su estructura porosa con poros interconectados de alta superficie específica y pequeño espesor, conllevan a un aumento de la velocidad de difusión del agente terapéutico, permitiendo mejorar la transferencia de masa y la eficiencia de la liberación [6, 7, 8]. Dependiendo de la morfología de las fibras, porosidad y composición de la matriz, es posible diseñar la forma de dosificación del agente terapéutico, de modo tal, que posea una cinética de liberación rápida, retardada o modificada. Además, la técnica de electrohilado permite la preparación de matrices fibrosas con agente terapéutico incorporado, facilitando la carga de agente en simultáneo con la formación de fibras [9].

La biodisponibilidad de agentes terapéuticos poco solubles en medio acuoso, con actividad farmacológica para el tratamiento de varias enfermedades es un problema bien conocido en la industria farmacéutica.

Aproximadamente el 40 % de los agentes descubiertos en los últimos años, son compuestos poco solubles o lipofílicos, que poseen una biodisponibilidad oral limitada, absorción impredecible y falta de proporcionalidad en la dosificación. Existen varias estrategias reportadas para resolver estas limitaciones, tales como el uso de dispersiones sólidas, emulsiones, liposomas, nanopartículas, y ciclodextrinas, entre otros. El empleo de matrices micro/nanofibrosas con agentes terapéuticos incorporados, también ha sido reportado como una estrategia para mejorar la biodisponibilidad de este tipo de agentes, mediante aplicación oral y tópica [10]. Sin embargo, la investigación de micro/nanofibras en el campo de liberación controlada se encuentra en una etapa inicial de exploración [11].

El proceso de liberación de agentes terapéuticos a partir de matrices micro/nanofibrosas puede ocurrir por distintos mecanismos que incluyen, procesos de difusión pura o mecanismos más complejos de difusión simultánea con degradación de la matriz polimérica [12]. En general, el perfil de liberación depende de la calidad de la dispersión del agente en la matriz polimérica, el cual normalmente se disuelve en la solución polimérica antes del proceso de electrohilado. Dependiendo de las propiedades de los agentes terapéuticos y del polímero, este método puede conducir a que los agentes se encuentren homogéneamente dispersos en las fibras, o en forma de agregados distribuidos aleatoriamente en las fibras o localizados en la superficie de la matriz micro/nanofibrosa (Fig. 3.2.a). Esta aproximación posee algunas desventajas inherentes a la técnica, como por ejemplo una liberación significativa del agente en un periodo inicial muy corto [13]. Esta liberación puede considerarse indeseable en algunas aplicaciones tales como ingeniería de tejidos, pero puede resultar muy útil en casos en los que se requiere una liberación rápida, como sucede en aplicaciones para el tratamiento de las infecciones que pueden ocurrir en las primeras horas después de una cirugía. El perfil de liberación puede modificarse, disminuyendo el porcentaje de liberación inicial del agente, mediante cambios en la composición del polímero, por mezcla con otro polímero o copolimerización con otro monómero, o recubrimiento la superficie de las fibras con otro polímero [14, 15]. La técnica de electrohilado de emulsiones posee una ventaja importante respecto de la técnica de mezclado, al permitir que tanto el polímero como el agente se

disuelvan en un solvente apropiado, eliminando la necesidad de un solvente común. De esta manera se han electrohilado varias combinaciones de fármacos hidrofílicos y polímeros hidrofóbicos

Un método alternativo que permite sobrellevar alguna de estas desventajas consiste en la encapsulación de agentes terapéuticos en el centro de nanofibras poliméricas mediante electrohilado coaxial. Esta técnica produce nanofibras que incorporan el agente terapéutico en el núcleo (*core*) que se recubre con una capa exterior de polímero (*shell*) (Fig. 3.2.b). Los dos componentes tienen normalmente diferente solubilidad en solventes orgánicos o en agua, lo que evita el mezclado de las dos fases durante el proceso. La liberación se produce por difusión del agente a través de la matriz polimérica externa, mediante poros de la cubierta polimérica o simultánea con la degradación de la misma. Este sistema coaxial permite una eficiencia de carga elevada y un comportamiento de liberación controlada que en muchos casos supera al observado en otros métodos convencionales de encapsulación. Un ejemplo reportado de este tipo de encapsulación, es el de la enzima lactato dehidrogenasa en nanofibras de poli(vinilalcohol) (PVA), mediante el empleo de electrohilado coaxial [16].

La incorporación de agentes terapéuticos puede realizarse después de la preparación de la matriz micro/nanofibrosa, mediante técnicas de modificación superficial de adsorción o inmovilización, cada una de las cuales posee ventajas y desventajas propias (Fig. 3.2.c y d).

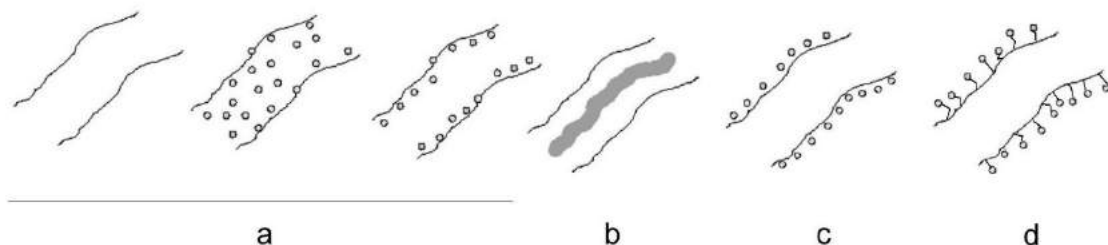


Fig. 3.2. Formas de incorporación de agentes terapéuticos en micro/nanofibras. a) Incorporación por mezclado en la solución de electrohilado; b) electrohilado coaxial; c) adsorción superficial; d) inmovilización superficial.

Entre los agentes terapéuticos incorporados en sistemas electrohilados estudiados se encuentran muchos compuestos farmacológicamente activos que se emplean como agentes modelo: antibióticos altamente o poco solubles en agua (hidrocloruro de tetraciclina, rifampicina, cefoxitina, ciprofloxacina, sulfato de gentamicina, ornidazol, mupirocin), antiinflamatorios no-esteroides (naproxeno, salicilato sódico, diclofenaco sódico, ketoprofeno, indometacina), corticoides (acetado de dexametasona), anestésicos (lidocaína), antioxidantes (resveratrol), vitaminas (A y E), antifúngicos (itraconazol, ketanserina, ketoconazol), anticancerígenos (paclitaxel, doxorubicina, carmustina BCNU, cucurbitacin B, cucurbitacin I), anticoagulantes (heparina), extractos vegetales (centella asiática, embelina, chalconas), proteínas (principalmente factores de crecimiento, albúmina, lisozima), vacunas y plásmidos de ADN [17, 18, 19]. Entre los polímeros se incluyen polímeros biodegradables hidrofílicos, hidrofóbicos y anfifílicos.

Aunque se han preparado muchos tipos de sistemas de liberación empleando matrices electrohiladas, hasta la fecha, los resultados reportados respecto de experimentos clínicos son muy pocos, algunos de estos trabajos realizados *in vivo* están principalmente asociados con la investigación en cáncer [20]. La liberación controlada y vectorizada de agentes anticancerígenos, constituye una de las áreas de mayor investigación [21, 22]. Las matrices electrohiladas poseen la capacidad de evitar las limitaciones en la carga de agentes que poseen las micelas y liposomas usadas actualmente para el tratamiento de tumores. La utilización de matrices nanofibras también tiene notable interés para liberación de agentes terapéuticos tales como factores de crecimiento capaces de promover la fijación, proliferación y diferenciación celular en ingeniería de tejidos, así como para la liberación de plásmidos de ADN para terapia génica. En este último caso resulta importante proteger los agentes biológicos que son incorporados a las matrices, dado que el proceso de electrohilado puede degradar el ADN, perdiendo la capacidad de transfección del plásmido [23, 24, 25].

La liberación de antibióticos en la región abdominal luego de una cirugía invasiva es una estrategia común para evitar las complicaciones asociadas a infecciones [26]. El empleo de matrices micro/nanofibras como barreras físicas para evitar la adhesión abdominal posquirúrgica entre tejidos

adyacentes en conjunto con la incorporación de agentes terapéuticos con actividad antimicrobiana, antifúngica, y cicatrizante, posicionan a estas matrices electrohiladas como sistemas con una doble funcionalidad y gran potencialidad. El tamaño de poro submicrométrico evita la migración celular, requerimiento fundamental para actuar como barrera, mientras que la elevada área superficial permite una carga de agente mayor que en otras morfologías [27].

En la Fig. 3.3. se esquematizan las aplicaciones de los sistemas electrohilados en el campo de la liberación controlada.

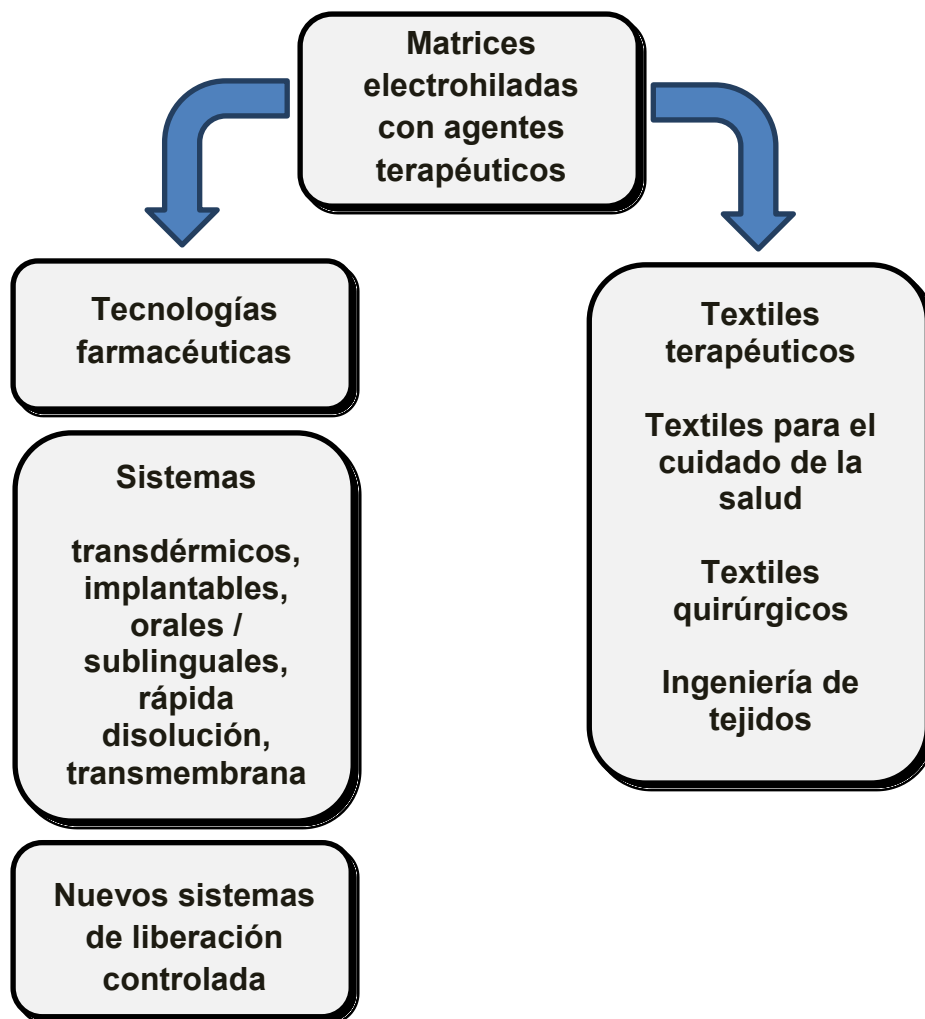


Fig. 3.3. Aplicaciones de los sistemas electrohilados en el campo de la liberación controlada

Uno de los avances recientes en el desarrollo de sistemas de liberación más eficientes consiste en las terapias de combinación, tales como

administración de múltiples fármacos con un mismo o diferente efecto terapéutico para mejorar los resultados de los tratamientos tradicionales. La preparación de este tipo de sistemas con un control independiente de cada agente en una matriz nanofibrosa no es fácil de lograr con una sola formulación. Al presente, existen varias estrategias para obtener sistemas de liberación de multifármacos programables: a) electrohilado secuencial, donde el diámetro de fibra y el espesor de cada capa son las variables efectivas para el control de la velocidad de liberación; b) incorporación de micropartículas con agentes terapéuticos producidas por electrospray en matrices electrohiladas; c) nanofibras con multicapas producidas a través de adsorción capa por capa de polielectrolitos; d) coelectrohilado o electrohilado simultáneo de dos microchorros con diferentes agentes para alcanzar propiedades independientes y combinadas en poblaciones de fibras diferentes.

En cualquier caso, la caracterización de estos sistemas poliméricos micro y/o nanoestructurados con agentes terapéuticos resulta de crucial importancia para analizar la distribución, morfología, grado de dispersión del agente en la matriz polimérica y la interacción del agente con el material polimérico, que en conjunto determinan el perfil y la cinética de liberación.

En el presente capítulo, se preparan matrices electrohiladas y filmes de PCL incorporando distintas cantidades de embelina y empleando diferentes solventes. Los sistemas obtenidos se caracterizan empleando una amplia variedad de técnicas experimentales para estudiar la influencia de la embelina en las propiedades fisicoquímicas, térmicas y superficiales. Asimismo, se busca analizar la calidad de la dispersión de embelina en matrices poliméricas obtenidas mediante diferentes técnicas.

3.2. Materiales

Las matrices poliméricas se prepararon a partir de poli(ϵ -caprolactona) de peso molecular $80 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ y embelina (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona) obtenida como se indicó en la sección 1.3. Las soluciones poliméricas se prepararon empleando como solventes diclorometano (DCM), metanol (MeOH) y dimetilformamida (DMF), obtenidos de Aldrich Chemical Co.

(St Louis, MO, USA), los que se emplearon tal como se recibieron, sin purificación adicional.

3.3. Métodos

3.3.1. Preparación de matrices poliméricas fibrosas mediante electrohilado de soluciones

3.3.1.1. Matrices poliméricas fibrosas

Las matrices poliméricas fibrosas se prepararon a partir de soluciones de PCL en mezcla de solventes DCM:MeOH (1:1) y DCM:DMF (1:1), con concentraciones de 10 y 18 % p/v, respectivamente; siguiendo el procedimiento detallado en la sección 2.2.2. Las características de las soluciones y condiciones de procesamiento empleadas, se muestran en la Tabla 3.1.

3.3.1.2. Matrices poliméricas fibrosas con embelina

Las matrices poliméricas fibrosas con embelina se prepararon a partir de soluciones de PCL en mezcla de solventes DCM:MeOH (1:1) y DCM:DMF (1:1) con concentraciones de 10 y 18 % p/v respectivamente, incorporando embelina en cantidades de 5 % en soluciones DCM:MeOH y 1,5; 3 y 5 % en soluciones de DCM:DMF respecto de la masa de PCL. Los recipientes donde se prepararon las soluciones fueron protegidos de la luz durante el proceso de disolución, y mantenidos bajo agitación magnética a temperatura ambiente.

El procedimiento empleado en la preparación de las matrices fue el detallado en la sección 2.2.2, de acuerdo a las características de la solución y condiciones de procedimiento detalladas en la Tabla 3.1.

Las cantidades de agente terapéutico incorporado en las matrices poliméricas se seleccionaron asumiendo la concentración inhibitoria mínima (MIC) de embelina reportada. Feresin *et al.* [28] reportaron un MIC de embelina de 100 mg.ml⁻¹ en actividades contra *Trypanosoma cruzi tripomastigotes*. Radhakrishnan *et al.* [29] reportaron actividad bactericida de embelina en organismos Gram-positivos y actividad bacteriostática en organismos Gram-

negativos, con MIC menor a $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. En base a los reportes mencionados, se determinó incorporar una cantidad de embelina suficiente para asegurar tanto la actividad bactericida como tripanocida.

Tabla 3.1. Condiciones de procesamiento de matrices fibrosas de PCL

Muestra	Conc. PCL (% p/p)	Conc. E/PCL (% p/p)	Solvente (v:v)	T (kV)	Φ ($\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$)	d (cm)
PCLA	10	-	1:1 ^a	17	0,6	12
PCL	18	-	1:1 ^b	20	0,6	12
PCLE5A	10	5	1:1 ^a	17	0,6	12
PCLE5	18	5	1:1 ^b	20	0,6	12
PCLE3	18	3	1:1 ^b	20	0,6	12
PCLE1.5	18	1,5	1:1 ^b	20	0,6	12

^a DCM:MeOH

^b DCM:DMF

^c Cabe remarcar que la nomenclatura refleja el tipo de solvente (indicando con "A" la mezcla DCM:MeOH y sin ninguna letra la mezcla DCM:DMF) y la concentración de embelina, E5, etc.

3.3.2. Preparación de filmes mediante colada de soluciones

Los filmes, que pueden considerarse también como matrices no porosas, se prepararon a partir de soluciones de PCL en mezcla de solventes CM:MeOH (1:1) y DCM:DMF (1:1) con concentraciones de 10 y 18 % p/v, respectivamente; incorporando cantidades de embelina de 18 y 5 % respecto de la cantidad de PCL, respectivamente. Los recipientes donde se prepararon las soluciones se protegieron de la luz durante el proceso de disolución y se mantuvieron bajo agitación magnética a temperatura ambiente.

El procedimiento empleado para la preparación de las matrices no porosas fue colada de las soluciones poliméricas (5 ml) en cajas de Petri (4,6 cm de diámetro). El secado se llevó a cabo bajo campana a temperatura ambiente durante 24 h. Finalmente las muestras se secaron al vacío para eliminar el solvente residual.

En la Tabla 3.2 se muestran los filmes de PCLE preparados con el correspondiente contenido de embelina incorporado y la mezcla de solventes utilizada.

Tabla 3.2. Filmes obtenidos mediante colada de soluciones

Muestra	Conc. E/PCL (% p/p)	Mezcla de solventes (v:v)
PCLfE18A	18	1:1 ^a
PCLfE5	5	1:1 ^b

^a DCM:MeOH, ^b DCM:DMF

Resulta importante mencionar que estos filmes PCLfE5 preparados a partir de soluciones de DCM:DMF requirieron un tratamiento térmico para desmolde, consistente en dos ciclos de vacío a 40 °C durante 2 h por ciclo. De esta manera se aseguró la eliminación completa de la DMF.

3.4. Caracterización fisicoquímica y morfológica

3.4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las matrices poliméricas se analizó mediante SEM, utilizando el microscopio y la técnica de preparación de muestras descritos en la sección 2.4.1.

Las micrografías SEM se analizaron a fin de obtener información relevante respecto de la estructura en la escala micro y nanométrica. En las matrices fibrosas se determinó la distribución de diámetro de fibras y diámetro medio de fibra mediante el procesamiento con el software Image-Pro Plus, empleando el procedimiento descrito en la sección 2.5.3. Los valores de diámetro de fibra se expresan como valor medio \pm desviación estándar (d.e.).

Las diferencias estadísticas entre el diámetro de fibra de las matrices de su cara al aire respecto de su cara en contacto con el colector de aluminio, se determinaron mediante la aplicación de test de *Student* con un intervalo de confianza de 99%.

3.4.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica termoanalítica en la que se analizan las variaciones del flujo de calor de una muestra contenida en una cápsula hermética y una referencia (cápsula vacía). Estas variaciones ocurren cuando se mantienen ambas cápsulas a la misma temperatura durante un determinado programa de calentamiento o enfriamiento. En otras palabras, se registra el flujo extra de calor que el calorímetro debe suministrar a la muestra o a la referencia para mantener ambas cápsulas a la misma temperatura, en función de la temperatura. El área de los picos limitados por la línea de base es una medida de la energía (entalpía) del proceso. El análisis DSC permite determinar las transiciones térmicas endo o exotérmicas que sufre la muestra a medida que varía la temperatura. Dado que los picos observados pueden ser el resultado de varios procesos simultáneos en muchos casos esta técnica requiere de la realización de otros estudios complementarios. Las aplicaciones incluyen el cálculo de la capacidad calorífica, efectos térmicos, pureza, temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de cristalización (T_c), temperatura de fusión (T_m), cinéticas de reacción y cristalización, entalpías de fusión y cristalización (ΔH_m y ΔH_c , respectivamente) de las cuales se obtiene el grado de cristalinidad (X_c) y diagramas de fase entre muchas otras. En esta tesis la T_g , transición de segundo orden, se midió en el inicio de la transición y la X_c se calculó mediante la relación (ecuación 3.1):

$$(3.1)$$

donde se tomó como valor de ΔH_m teórico el de la entalpía de fusión para PCL 100% cristalina ($148,05 \text{ J.g}^{-1}$) [30]. Se evaluaron las propiedades térmicas de PCL, embelina y matrices con embelina empleando un calorímetro PerkinElmer Inc., Modelo Pyris 1 (Waltham, MA, USA), con velocidad de calentamiento $5 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ y barrido de nitrógeno.

3.4.3. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía vibracional, en particular la espectroscopía infrarroja (FTIR) brinda información acerca de la estructura molecular. El espectro infrarrojo se origina por la absorción de radiación de frecuencia que está en resonancia con una transición vibracional determinada.

Las moléculas tienen frecuencias características en las cuales poseen movimientos de rotación y vibración con niveles de energía discretos (modos normales de vibración). Las frecuencias resonantes o frecuencias de vibración son determinadas por la forma de las superficies de energía potencial molecular, las masas de los átomos y, eventualmente por el acoplamiento vibratorio asociado. Para que un modo de vibración en una molécula sea activo al infrarrojo, debe estar asociado con cambios en el dipolo eléctrico de la molécula. Sin embargo, las frecuencias resonantes pueden estar en una primera aproximación relacionadas con la fuerza de enlace y la masa de los átomos a cada lado del mismo. Así, la frecuencia de las vibraciones puede ser asociada con un tipo particular de enlace [31, 32]. Es posible entonces obtener información de la composición química de la superficie de las muestras (0,5 a 1,5 μm de profundidad), mediante la irradiación del material con radiación electromagnética en el rango del infrarrojo (4000 a 400 cm^{-1}). Esta zona de radiación electromagnética se denomina “huella digital”, dado que permite la identificación de sustancias de manera unívoca [33].

La reflectancia total interna atenuada (ATR-FTIR) es la aplicación de este método espectroscópico a la observación de superficies acoplado con el fenómeno físico de reflexión total interna (reflexión y refracción de radiación electromagnética en la interfase de dos medios de diferente índice de refracción) para restringir el volumen de análisis a la región superficial de la muestra. El haz infrarrojo es reflejado en la cara interna de un prisma transparente y con alta reflectancia, mientras que la superficie a ser examinada es colocada en perfecto contacto con la cara del prisma en el que ocurre la reflexión, limitando el volumen de análisis a la región superficial de la muestra.

El estudio de las características y composición de las matrices con embelina, se realizó mediante un espectrómetro infrarrojo por transformada de

Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ART) Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA, USA).

3.4.4. Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X proporciona información sobre la estructura química y cristalina de los materiales. Los rayos X son radiación electromagnética de longitud de onda de aproximadamente 1 \AA (10^{-10} m), que es del orden de la distancia interatómica. Cada sólido cristalino posee un patrón característico de difracción, que puede emplearse para su identificación [34].

En el caso de materiales poliméricos, que pueden ser amorfos o semicristalinos, es posible determinar a través de este método el grado de cristalinidad de los mismos. Sin embargo, en la determinación de las estructuras cristalinas de polímeros, la interpretación de los resultados experimentales es mucho más compleja que en el caso de cristales de moléculas más simples. Las razones de esta dificultad son varias. En primer lugar, la mayoría de los polímeros no pueden obtenerse cristales grandes con la suficiente perfección, eliminando así la utilización de un número de técnicas difractométricas modernas. En segundo lugar, debido al débil enlace en ciertas direcciones, la intensidad disminuye rápidamente con 2θ , y el análisis debe efectuarse basándose solamente en unas pocas reflexiones y perdiendo así precisión. Por último, la localización exacta de los grupos laterales, dentro de la red cristalina, tiene un efecto pequeño en las intensidades difractadas, reduciendo la sensibilidad de la técnica. Debido a todas estas dificultades, la determinación de la estructura cristalina completa requiere una gran especialización y se emplea solamente al sintetizarse un nuevo polímero cristalino, aunque el diagrama de difracción de una muestra puede usarse como método de identificación del polímero del que se trate [35].

En algunos casos, la difracción de rayos X se emplea para obtener información en ciertos sistemas poliméricos interesantes desde el punto de vista práctico. Por ejemplo, si tenemos una mezcla de polímeros puede haber

una separación de fases de los dos polímeros que lo constituyen. Si uno o ambos cristalizan se puede identificar mediante DRX [36].

El análisis mediante difracción de rayos X (DRX) de las matrices, se realizó empleando un difractómetro (PANalytical X'Pert PRO, PANalytical BV, Almelo, The Netherlands) equipado con una unidad PW3710, sistema de *soller slits* y monocromador. Se empleó una fuente de rayos X (Philips PW 1830, PANalytical BV) con un ánodo de cobre, una tensión de 40 kV y una corriente de 40 mA. Los difractogramas se obtuvieron efectuando un barrido de 2θ en el rango entre 5° y 75° con una resolución de $2\theta = 0,02^\circ$ y una frecuencia de 1 s por paso.

3.4.5. Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) también llamada espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA) es el método de caracterización de superficies más ampliamente utilizado en la actualidad. La popularidad de la técnica deriva del alto contenido de información que suministra y la flexibilidad para utilizarse en una gran variedad de muestras. Es una técnica analítica cualitativa y cuantitativa, con una resolución espacial de 10 nm de profundidad. Habitualmente se utiliza para la identificación de todos los elementos presentes (excepto H y He) en concentraciones mayores al 0.1%, la determinación semicuantitativa de la composición elemental de la superficie (con un error $\leq \pm 10\%$), brindar información acerca del entorno molecular (estado de oxidación, átomos enlazantes, orbitales moleculares, etc), información sobre estructuras aromáticas o insaturadas a partir de las transiciones $\Pi - \Pi^*$, variaciones en la composición de la superficie.

Los espectros XPS se obtienen cuando una muestra se irradia por rayos X (habitualmente el ánodo puede ser de Al o Mg) al tiempo que se mide la energía cinética y el número de electrones que escapan de la superficie del material analizado. Para una medición de XPS se requieren condiciones de ultra-alto vacío debido a que a presiones mayores la tasa de adsorción de contaminación sobre la muestra puede ser del orden de varias monocapas atómicas por segundo, impidiendo la medición de la superficie que realmente se quiere analizar.

Los análisis de XPS se realizaron en un equipo Multitécnica SPECS (CENACA – UNL, INCAPE – CONICET, Santa Fé, Argentina) equipado con una fuente de rayos X dual Mg/Al y un analizador hemiesférico PHOIBOS 150 en el modo transmisión analizador fijo (FAT), Energy Pass 30 eV. Se trabajó con ánodo de Mg operado a 100 W. La presión durante la medida fue menor a 2.10^{-8} mbar.

Las muestras fueron soportadas sobre cinta de doble faz de Cu y evacuadas 12 horas, previo a los análisis.

3.5. Análisis de la incorporación de embelina en matrices poliméricas

3.5.1. Preparación de matrices poliméricas con embelina y caracterización morfológica

La Fig. 3.4 muestra las micrografías SEM de las matrices poliméricas de PCL con embelina. En las matrices producidas mediante electrohilado, el diámetro y la morfología de las micro/nanofibras dependen de las propiedades intrínsecas de la solución, parámetros del procesamiento y factores ambientales (secciones 1.5.1.1 y 1.5.1.2). Como se puede observar en las Fig. 3.4 b y d, el conjunto de condiciones experimentales seleccionado condujo a la producción de fibras uniformes y continuas. Las Fig. 3.4 a y c muestran las micrografías SEM de los filmes de PCLfE18A y PCLfE5, respectivamente.

Las Fig. 3.4 a y b revelan que las matrices preparadas a partir de DCM:MeOH poseen estructuras en forma de aguja que se pueden atribuir a la presencia de una fracción de embelina cristalizada. Si bien en los filmes estas estructuras se encuentran mayormente localizadas en la superficie, esta característica morfológica podría no estar directamente relacionada con la cristalinidad. De esta manera, la distribución de los cristales en la matriz no es necesariamente uniforme. Sin embargo, en las matrices fibrosas, la técnica de electrohilado permite una distribución de embelina y la fase cristalina más homogénea en toda la matriz polimérica.

En las micrografías de las Fig. 3.4 c y d, se observa la ausencia de los cristales en forma de aguja, lo que en principio podría atribuirse a una mejora

en la calidad de la dispersión de embelina en la matriz polimérica de los sistemas con DCM:DMF (1:1).

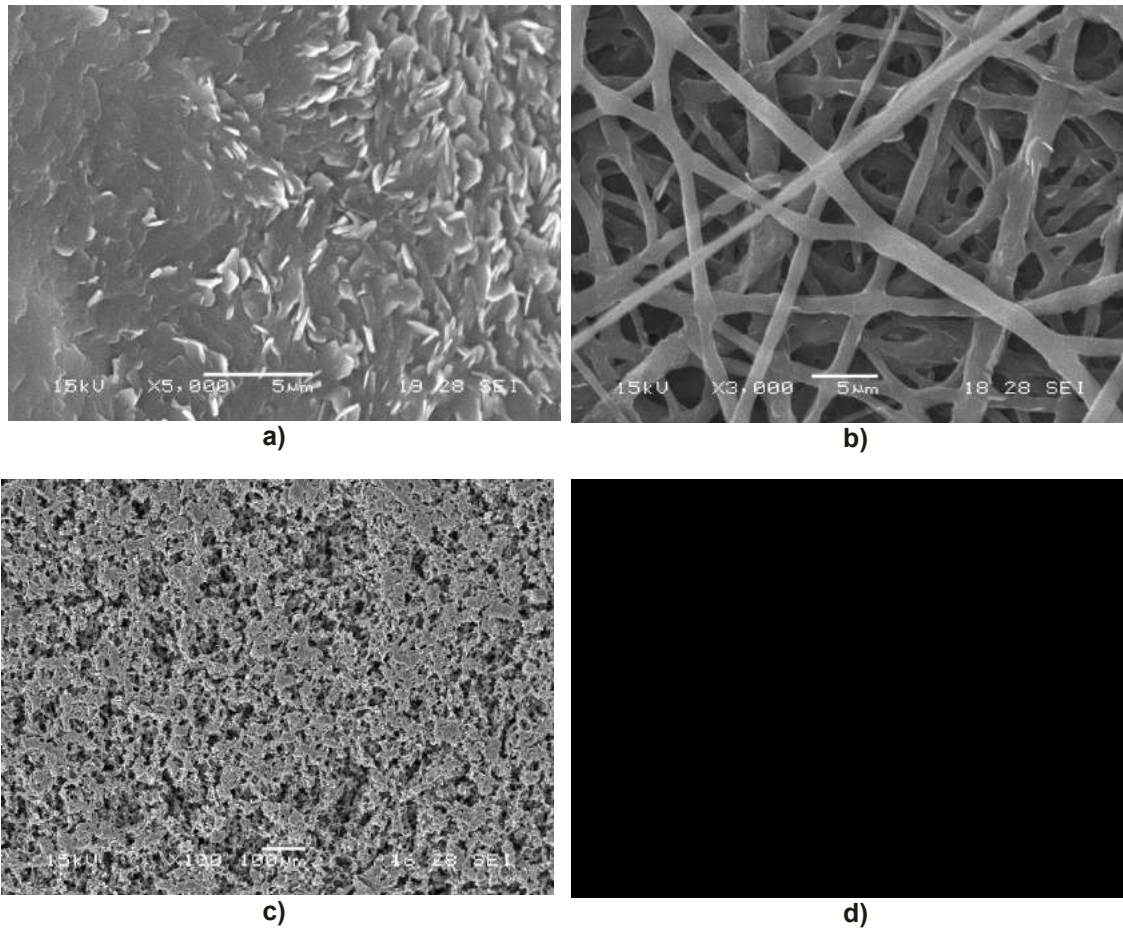


Fig. 3.4. Micrografías SEM de las matrices y filmes de PCL con embelina dispersa, a) PCLfE18A, b) PCLE5A, c) PCLfE5 y d) PCLE5.

El procesamiento mediante el software Image-Pro Plus de las micrografías de las matrices fibrosas, permitió determinar el diámetro medio de fibra y la distribución de diámetro de fibras, que se muestran en la Tabla 3.3 y en la Fig. 3.5, respectivamente.

Tabla 3.3. Diámetro medio de fibra (D_m) de matrices electrohiladas.

Muestra	$D_m \pm \text{d.e.} (\mu\text{m})$
PCLA	$1,267 \pm 0,576$
PCLE5A	$1,286 \pm 0,667$
PCL	$0,274 \pm 0,090$
PCLE1,5	$0,276 \pm 0,080$
PCLE3	$0,287 \pm 0,090$
PCLE5	$0,296 \pm 0,090$

A partir de los resultados obtenidos es posible establecer que no existe una variación significativa del diámetro de fibra de las matrices de PCL debido a la incorporación de embelina. Sin embargo resulta evidente la disminución de diámetro de fibra obtenido a partir de soluciones poliméricas en DCM:DMF. La formación de fibras con menor diámetro ocurre cuando se emplean solventes con alto momento dipolar, propiedad que favorece la conducción de cargas en la solución durante el proceso de electrohilado.

Los solventes empleados poseen una temperatura de ebullición $T_{\text{eb DCM}} = 39,6 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{\text{eb MeOH}} = 65 \text{ }^\circ\text{C}$ y $T_{\text{eb DMF}} = 153 \text{ }^\circ\text{C}$, y momento dipolar $\mu_{\text{DCM}} = 1.60 \text{ D}$, $\mu_{\text{MeOH}} = 1,70 \text{ D}$ y $\mu_{\text{DMF}} = 3.86 \text{ D}$. La mezcla DCM:MeOH permitió la solubilización de PCL y embelina, con una combinación de solvente no polar y polar prótico, con temperaturas de ebullición y momentos dipolares bajos.

La mezcla DCM:DMF forma una solución binaria cuyos componentes puros tienen una importante diferencia en la temperatura de ebullición y el momento dipolar del DMF es muy alto. Estas características que le confieren a la mezcla DCM:DMF una importante capacidad para electrohilar poliésteres tales como PCL, PLLA y otros polímeros.

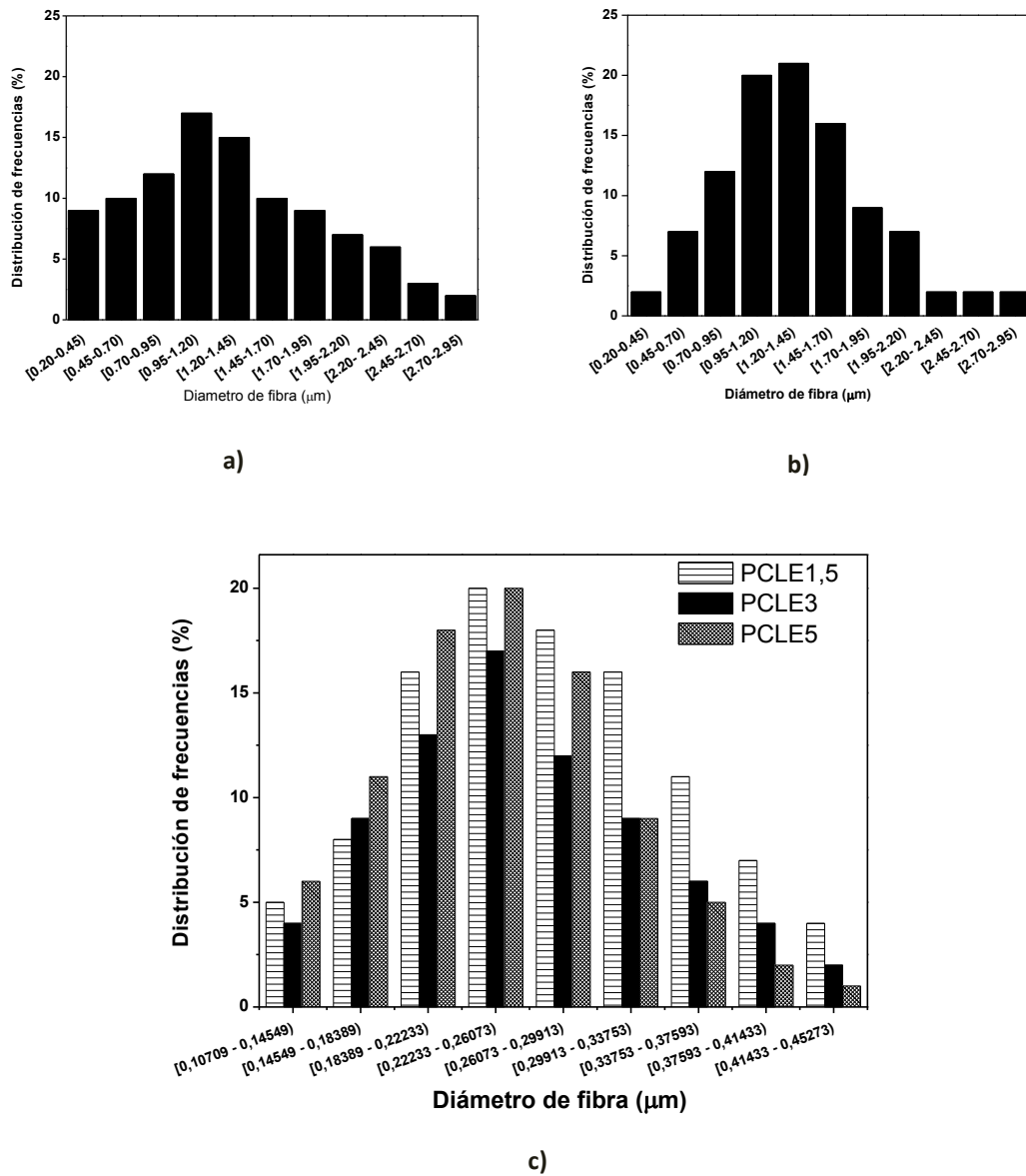


Fig. 3.5. Distribución de frecuencias de fibras electrohiladas en función del diámetro de fibras, a) PCLA, b) PCLE5A, c) PCLE1,5; 3; 5.

3.5.2. Análisis de las propiedades térmicas y cristalinidad

Los termogramas mostrados en la Fig. 3.6 corresponden a las matrices PCLE en DCM:MeOH, e indican una marcada disminución en la cristalinidad de embelina incorporada, evidenciando una alta disolución de la misma en la

matriz de PCL. Además, se observó una disminución de la cristalinidad de PCL en las matrices fibrosas respecto de los filmes. Estos cambios en la cristalinidad se atribuyen a las características inherentes a los procesos de electrohilado y colada de soluciones.

La Fig. 3.7 muestra los termogramas correspondientes a los sistemas preparados a partir de soluciones con DCM:DMF, mientras que en la Tabla 3.4 se muestran los resultados de las propiedades térmicas.

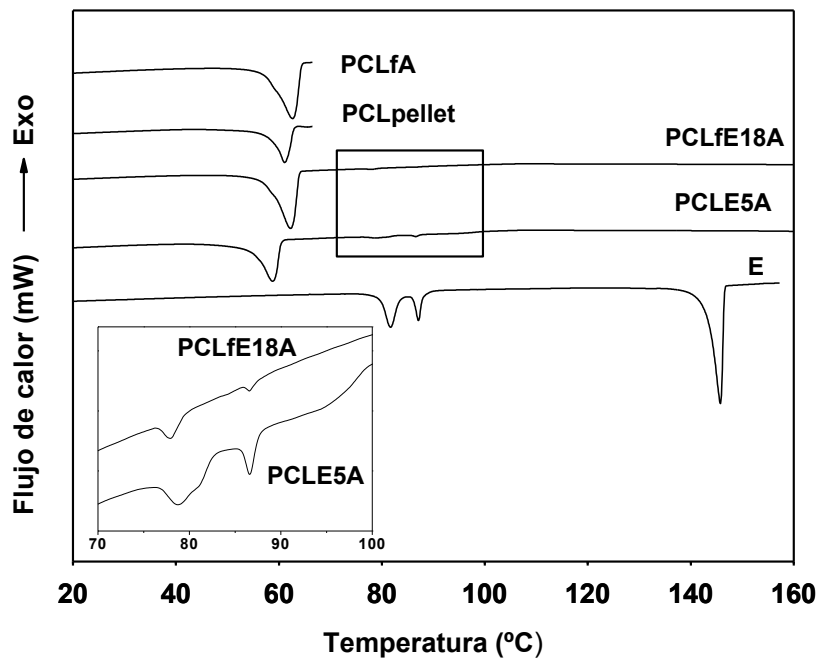


Fig. 3.6. Termogramas de embelina (E), pellet de PCL, PCLE (matrices fibrosas y filmes). El cuadro insertado en la figura muestra la magnificación de las señales correspondientes a la fusión de embelina.

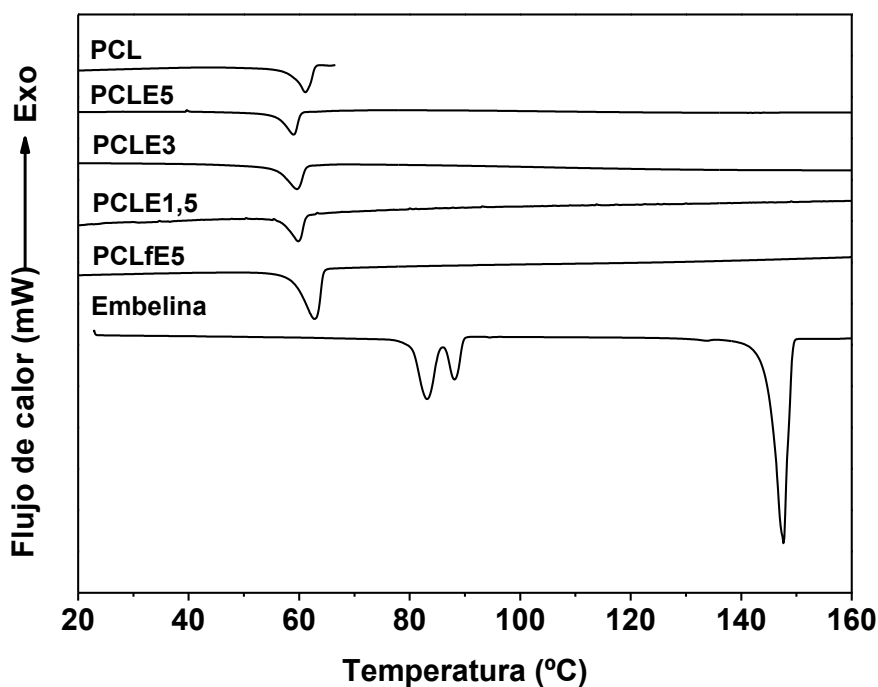


Fig. 3.7. Termogramas de DSC de PCL, PCLE5, PCLE3, PCLE1,5, PCLfE5, embelina.

Tabla 3.4. Propiedades térmicas de embelina, matrices fibrosas y filmes. ΔH_m , calor de fusión de PCL; ΔH_{mE} , calor de fusión de embelina; T_m , temperatura de fusión; X_{cPCL} , grado de cristalinidad de PCL; X_{cE} , grado de cristalinidad de embelina.

Muestra	T_m (°C)	ΔH_m (J.g ⁻¹)	X_{cPCL} (%)	ΔH_{mE} (J.g ⁻¹)	X_{cE} (%)
PCLfE18A	62,30	74,83	50,5	-	-
	77,90; 86,50	0,47	-	10,03	4,7
PCLE5A	58,80	63,51	42,9	-	-
	79,00; 86,60	2,16	-	16,60	13,0
PCL	61,10	53,05	35,8	-	-
PCLE5	58,97	75,50	53,2	-	-
PCLE3	59,53	74,24	51,6	-	-
PCLE1,5	59,89	72,44	49,7	-	-
PCLfE5	62,79	81,64	65,1	-	-
Embelina	81,7; 87,1	-	-	63,45	100
	145,8	-	-	129,68	-

El análisis de la Tabla 3.4 indica una marcada disminución en la cristalinidad de embelina incorporada en todas las matrices poliméricas, siendo completamente suprimida cuando se empleó DCM:DMF. Esto indica que DCM:DMF resulta una mezcla de solventes apropiada para una completa solubilización de embelina en PCL.

Además, se observó una disminución de la cristalinidad de PCL en las matrices fibrosas, que se puede atribuir a las características inherentes al proceso de electrohilado. La incorporación de embelina condujo a un incremento en la cristalinidad de PCL en las matrices fibrosas, siendo este incremento mayor con el contenido de embelina. Por lo tanto, resulta evidente que la embelina favorece el ordenamiento de cadenas de PCL que conduce a la formación de cristales. La estructura química de la embelina, con una cadena metilénica de 10 átomos de carbono, puede jugar un papel importante al asociarse mediante interacciones dispersivas con una fracción de las cadenas de PCL que permanece amorfa e incrementando el tiempo de cristalización de otra fracción de las cadenas.

En la Fig. 3.8 se muestran los difractogramas obtenidos mediante DRX, de embelina y matrices fibrosas preparadas a partir de soluciones con las diferentes mezclas de solventes. El difractograma de embelina muestra picos agudos característicos, en $2\theta = 5,81^\circ$; $11,70^\circ$; $14,63^\circ$; $17,59^\circ$; $29,53^\circ$; $32,63^\circ$ y $35,69^\circ$. Sin embargo, es notable la ausencia de estos picos al incorporar embelina en las matrices fibrosas. Esto indica que el agente terapéutico no presenta un ordenamiento cristalino una vez dispersado en las matrices poliméricas de PCL, tal como se observó en el análisis térmico efectuado por DSC. De cualquier manera, la embelina podría formar agregados amorfos tanto en la matriz polimérica como en regiones de la superficie de las fibras, por lo que resulta necesario realizar el estudio de la superficie de las matrices y su composición superficial.

Los picos presentes en los difractogramas de las matrices corresponden con los picos característicos de PCL ($2\theta = 21,40^\circ$ y $23,75^\circ$).

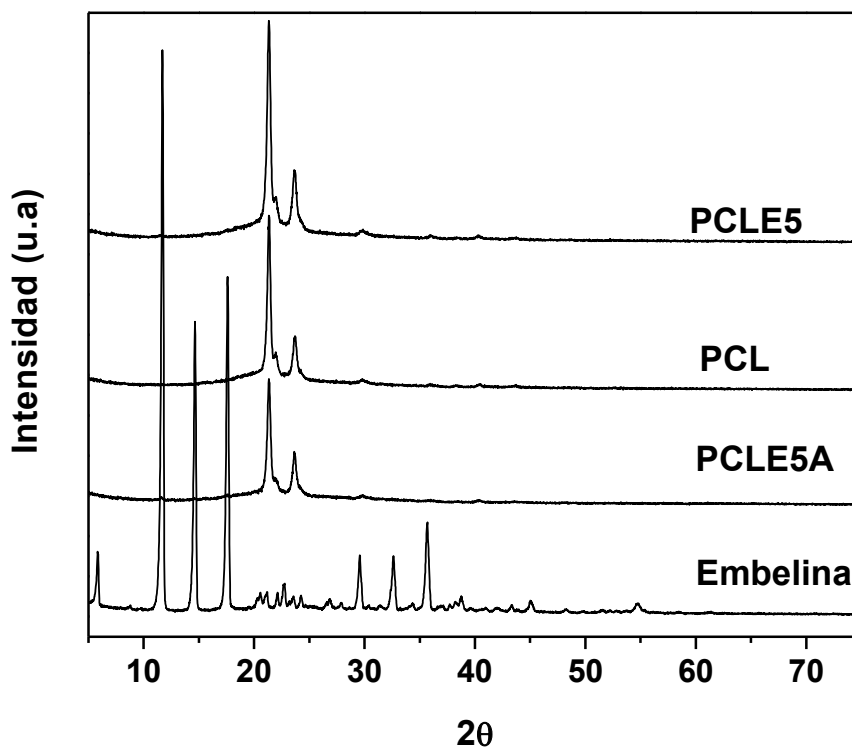


Fig. 3.8. Diffractogramas de embelina, PCL, PCLE5A y PCLE5

3.5.3. Caracterización de la superficie

El estudio de la superficie de las matrices fibrosas se realizó a fin de determinar su composición química superficial y comprender su interacción con el medio. En la Fig. 3.9 se muestran los espectros de ATR-FTIR característicos de embelina, pellet de PCL y de las matrices PCLE5A, PCLE5, PCL.

El espectro de embelina muestra picos característicos a 3300 cm^{-1} ($\nu\text{O-H}$); 2918 cm^{-1} y 2848 cm^{-1} ($\nu_a\text{C-H}$ y $\nu_s\text{C-H}$ en CH_2), y 1612 cm^{-1} ($\nu\text{C=C}$), 1462 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$ en $-\text{CH}_2$), 1375 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$ en $-\text{CH}_3$), 1219 cm^{-1} , ($\nu\text{C=O}$). Por otro lado, el espectro de pellet de PCL exhibe las señales típicas a 2943 y 2864 ($\nu_a\text{C-H}$ y $\nu_s\text{C-H}$ en CH_2), 1720 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$ en éster), 1398 cm^{-1} y 1368 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$ en CH_2), 1246 cm^{-1} y 1194 cm^{-1} ($\nu\text{C-O-C}$ en éster) y 1108 cm^{-1} ($\nu\text{C-O-C}$ en éter).

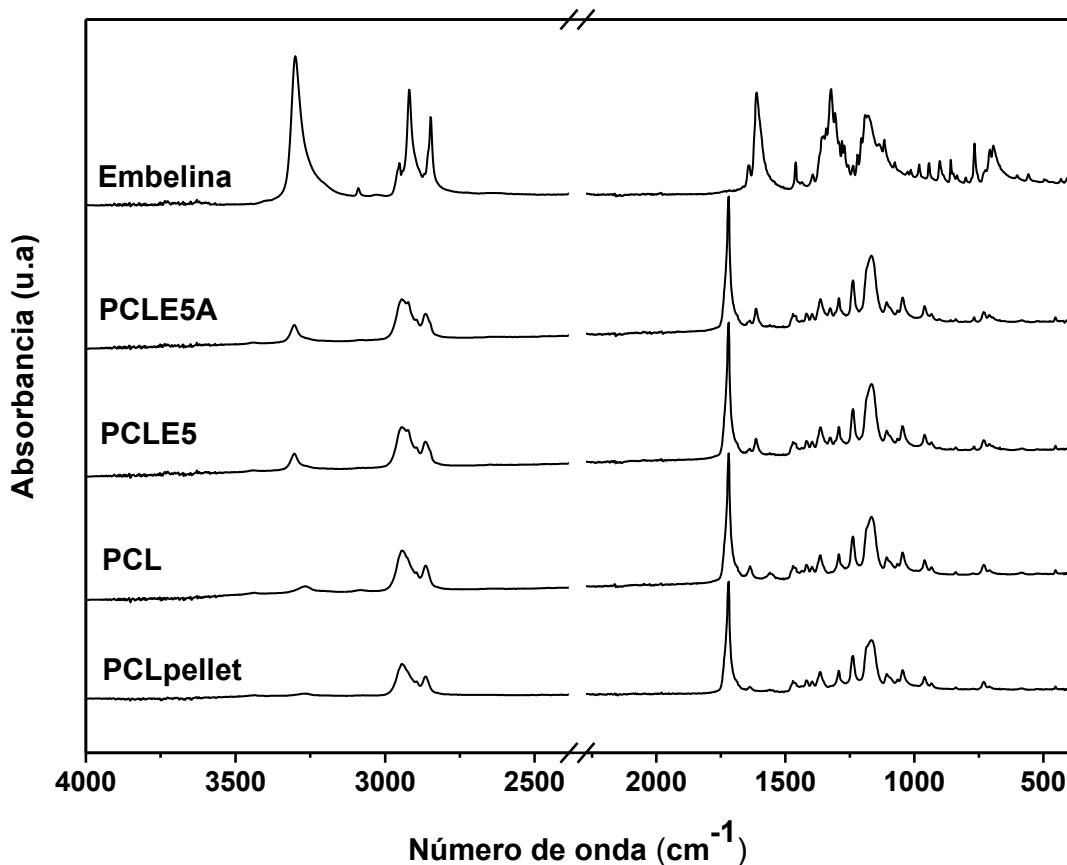


Fig. 3.9. Espectros de FTIR de embelina, PCLE5A, PCLE5, PCL y pellet de PCL

Los espectros de las matrices PCLE5A y PCLE5, muestran picos característicos asociados a la presencia de embelina en superficie ($3303,5$ y $1614,1 \text{ cm}^{-1}$). En las matrices PCLE5A, la presencia de embelina superficial puede interpretarse como agente no completamente disperso en la matriz de PCL, debido al uso de la mezcla de solventes DCM:MeOH (1:1). Por otro lado, en las matrices PCLE5 la presencia de embelina superficial podría deberse a la rápida evaporación del solvente asociada a la técnica de electrohilado, que impide el reordenamiento cristalino de la PCL, permitiendo la migración de embelina a la superficie de las fibras.

La composición de superficie de las matrices fibrosas de PCL y PCLE se determinó mediante XPS. La estructura química del polímero base (PCL)

mostró la presencia de carbono (C1s, 285 eV) y oxígeno (O1s, 532 eV), como se observa en la Fig. 3.10.

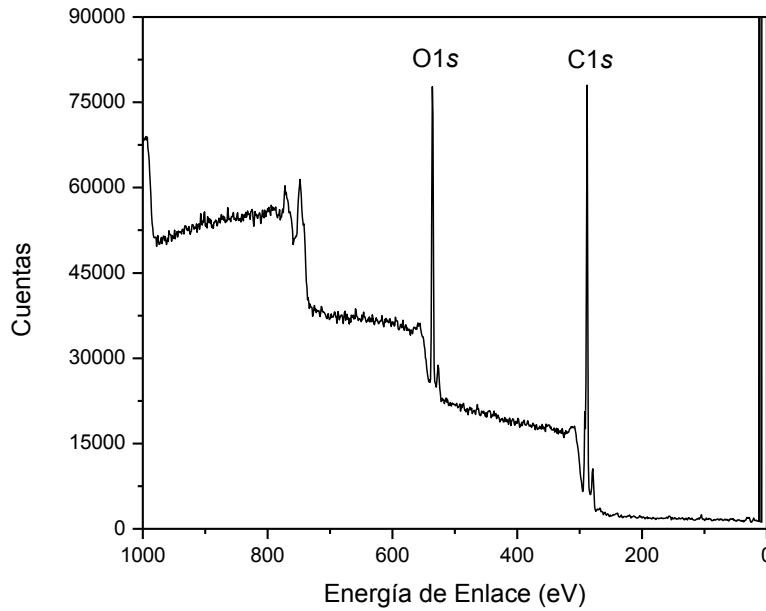


Fig. 3.10. Espectro XPS de PCL

El pico de C1s se ajustó con tres componentes correspondientes a las especies C*-C y C*-H (285 eV), C*-O (286,3 eV) y C*(=O)O (289 eV) (Fig. 3.11) [37], mientras que el pico de O1s se ajustó con dos componentes correspondientes a las especies C=O* y C(=O)O* (Fig. 3.12), listando las energías de enlace en la Tabla 3.5.

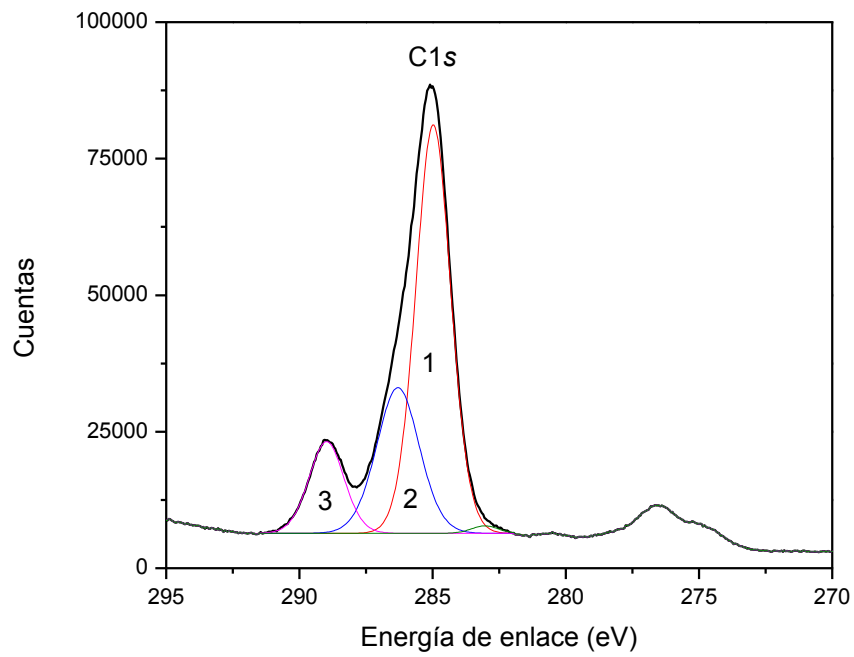


Fig. 3.11. Espectro XPS de PCL, región de C1s

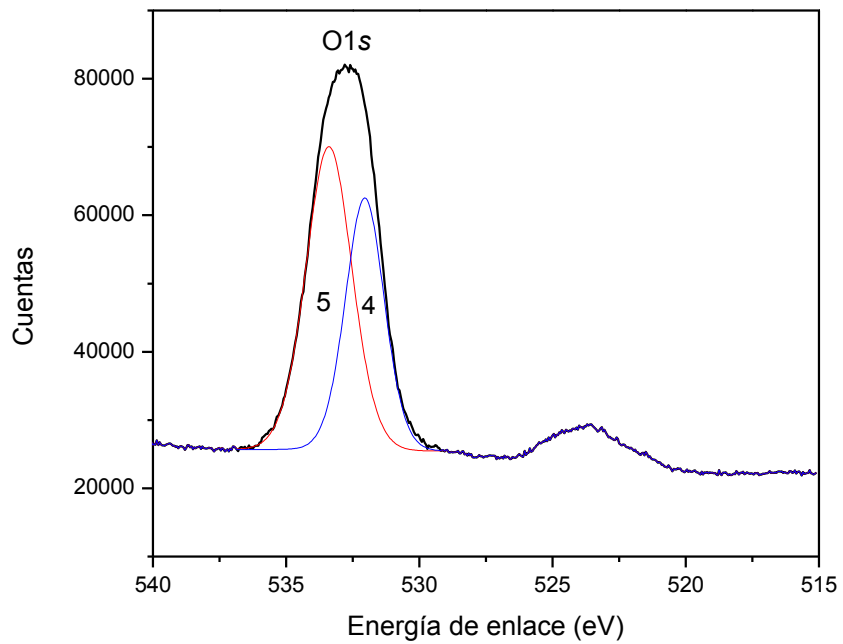


Fig. 3.12. Espectro XPS de PCL, región de O1s

Tabla 3.5. Energía de enlace de las distintas especies de C1s y O1s de las muestras de PCL y PCLE

	Energía de enlace (eV) ^a				
	PCL	PCLE3A	PCLE3	PCLE5A	PCLE5
C1s	285,0 (-2.9) ^b	285,0 (-2.4) ^b	285,0 (-2.6) ^b	285,0 (-2.3) ^b	285,0 (-2.7) ^b
C1s	286,3	286,4	286,5	286,6	286,4
C1s	289,0	289,0	289,1	289,1	289,1
O1s		529,6	531,4	531,3	531,3
O1s	532,0	532,1	532,0	532,1	532,1
O1s	533,4	533,5	533,3	533,4	533,3

^a Las señales se corrigieron para compensar el efecto de carga, ajustando el mayor componente de C1s a 285,0 eV.

^b Valor de corrimiento de la escala de energía respecto de la señal original para cada muestra.

Todas las muestras presentaron una banda a aproximadamente 102,2 eV correspondiente a Si2p, que puede atribuirse a un bajo nivel de contaminación por silicón (<1%).

Para el cálculo de las relaciones de área superficial se tomaron los valores de las señales de C1s y O1s, considerando que el valor del área se dividió por el producto del factor de respuesta de Scofield (RSF), el factor de transmisión y el camino libre medio (MFP). Los valores se muestran en la Tabla 3.6 y para mejor claridad se grafican en la Fig. 3.13.

Tabla 3.6. Relaciones de área superficial para muestras de PCL y PCLE

	Relación de área superficial C1s/O1s				
	PCL	PCLE3A	PCLE3	PCLE5A	PCLE5
C1s/O1s	3,335	3,329	3,402	3,569	3,322
(C/O) / (C/O)_{PCL}	1	0,998	1,020	1,070	0,996

La relación C1s/O1s observada (3,335/1) resultó ligeramente mayor a la relación teórica (3/1), debido a la presencia de una mayor cantidad de carbono adventicio [38].

Las matrices de PCLE mostraron diferentes valores de relación atómica C1s/O1s, encontrando la mayor desviación respecto de PCL en la muestra PCLE5A. Esto indica que la mezcla DCM:MeOH (1:1) conduce a una mayor cantidad de embelina en superficie. Esta es otra evidencia importante de que la

mezcla DCM:DMF (1:1) permite solubilizar mejor la embelina en PCL. Esta observación no se ve tan claramente en PCLE3, posiblemente por tratarse de una diferencia muy pequeña (2%).

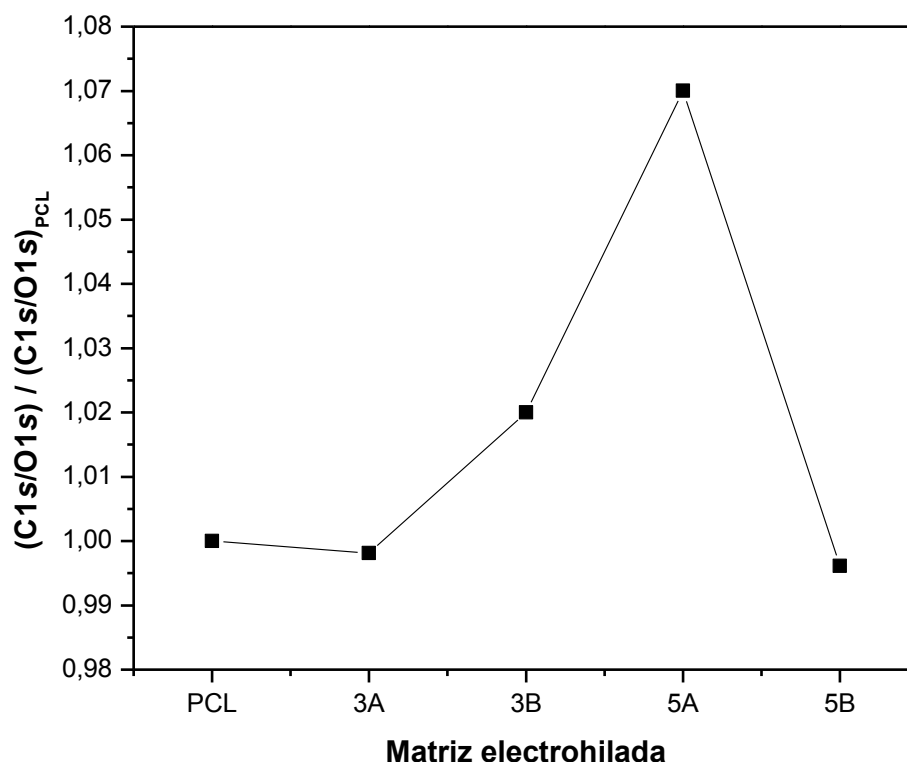


Fig 3.13. Relación de señales XPS C1s/O1s de las matrices con respecto a la relación C1s/O1s de PCL

3.6. Conclusiones parciales

Se prepararon matrices electrohiladas y filmes de PCL incorporando distintas cantidades de embelina y utilizando diferentes solventes. Las condiciones experimentales empleadas permitieron la obtención de matrices, que presentaron una morfología de fibras uniformes con diámetros que dependieron del tipo de solvente empleado. La mezcla DCM/DMF condujo a la formación de nanofibras de PCLE con una mejor calidad en la dispersión de embelina al encontrarse completamente amorfa en la matriz de PCL. El contenido de embelina no modificó la morfología y el diámetro medio de las

nanofibras, aunque produjo un incremento en la cristalinidad de PCL. Por lo tanto, resulta evidente que la presencia de embelina favoreció el ordenamiento de cadenas de PCL que conduce a la formación de cristales.

El análisis de la superficie de los sistemas PCLE permitió determinar la presencia embelina en la región superficial. La embelina debe encontrarse en forma de agregados amorfos dado que no se observaron evidencias de una fracción cristalina.

3.7. Referencias

- [1] M. Chasin, R. Langer, *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, New York - Basel - Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1990.
- [2] P. Couvreur, F. Puisieux, "Nano and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins". *Adv Drug Delivery Rev*, 10, 141 - 162, 1993.
- [3] E. Allémann, R. Gurny, E. Doelker, "Drug-loaded nanoparticles, preparation methods and drug targeting issues". *Eur. J Pharm Biopharm*, 39, 173 - 191, 1993.
- [4] P.M. Satturwar, S.V. Filzele, "Biodegradation and In vivo Biocompatibility of Rosin: a natural film forming polymer". *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 55(4), 1 - 6, 2003.
- [5] M.Vert, S.M. Li, G. Spenlehauer, P. Guerin, "Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters". *J. Mat. Sci.: Mater. Med.*, 6(3), 432 - 446, 1992.
- [6] T.J. Sill, H.A. von Recum, "Electrospinning: Applications in drug delivery". *Biomaterials*, 29(13), 1989 - 2006, 2008.
- [7] N. Bhardwaj, and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication". *Biotechnol. Adv*, 28(3), 325 - 347, 2010.
- [8] E-R. Kenawy, F.I. Abdel-Hay, M.H. El-Newehy, G.E. Wnek, "Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems". *Mat. Chem. Phys.*, 113(1), 296 - 302, 2009.
- [9] S. Chakraborty, I-C. Liao, A. Adler, K. W. Leong, "Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems". *Adv. Drug Del. Rev.*, 61(12), 1043 - 1054, 2009.
- [10] M. E. Brewster, G. Verreck, I. Chun, J. Rosenblatt, J. Mensch, A. Van Dijck, M. Noppe, A. Ariën, M. Bruining, J. Peeters, "The use of polymer-based electrospun nanofibers containing amorphous drug dispersions for the delivery of poorly water-soluble pharmaceuticals". *Pharmazie*, 59(5), 387 - 391, 2004.
- [11] D. G. Yu, L. M. Zhu, K. White, C. Branford-White, "Electrospun nanofiber-based drug delivery systems". *Health*, 2(1), 67 - 75, 2009.
- [12] R.L. Dahlin, F.K. Kasper, A.G. Mikos, "Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering". *Tissue Eng. Part B: Reviews*, 17, 349 - 364, 2011.

- [13] P.R. Cortez Tornello, G.E. Feresin, A. Tapia, I.G. Veiga, Â.M. Moraes, G.A. Abraham, T.R. Cuadrado, "Dispersion and release of embelin from electrospun biodegradable, polymeric, membranes". *Polymer J.*, 44(11), 1105 - 1111, 2012.
- [14] M.V. Natu, H.C. de Sousa, M.H. Gil, "Effects of drug solubility, state and loading on controlled release in bicomponent electrospun fibers". *Inter. J. Pharm.*, 397, 50 - 58, 2010.
- [15] Y-T. Jia, H-Y. Kim, J. Gong, D-R. Lee, "Electrospun nanofibers of block copolymer of trimethylene carbonate and ε-caprolactone". *J. Appl. Polym. Sci.*, 99, 1462 - 1470, 2005.
- [16] I. Moreno, V. González-González, J. Romero-García, "Control release of lactate dehydrogenase encapsulated in poly (vinyl alcohol) nanofibers via electrospinning". *Eur. Polym. J.*, 47(6), 1264 - 1272, 2011.
- [17] T. J. Sill, H. A. von Recum, "Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering". *Biomaterials*, 29(13), 1989 - 2006, 2008.
- [18] J. Xie, X. Li, Y. Xia, "Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research". *Macromol. Rapid. Commun.*, 29(22), 1775 - 1792, 2008.
- [19] S. Agarwal, J. H. Wendorff, A. Greiner. *Polymer*, 2008, 49, 5603, "Use of electrospinning technique for biomedical application". *Polymer*, 49(26), 5603 - 5621, 2008.
- [20] D. G. Yu, L. M. Zhu, K. White, C. Branford-White, "Electrospun Nanofiber-based Drug Delivery Systems". *Health*, 1(2), 67 - 75, 2009.
- [21] H. H. Huang, C. L. He, H. S. Wang, X. M. Mo, "Preparation of core-shell biodegradable microfibers for long-term drug delivery". *J. Biomed. Mater. Res. A*, 90(4), 1243 - 1251, 2009.
- [22] S. H. Ranganath, C. H. Wang, "Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma". *Biomaterials*, 29(20), 1996 - 3003, 2008.
- [23] Y.K. Luu, K. Kim, B.S. Hsiao, B. Chun, M. Hadjiargyrou, "Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLGA-PEG block copolymers". *J. Controlled Rel.*, 89(2), 341 - 353, 2003.
- [24] I.C. Liao, S. Chen, J.B. Liu, K.W. Leong, "Sustained viral gene delivery through core-shell fibers". *J. Controlled Rel.*, 139(1), 48 - 55, 2009.
- [25] A. Saraf, L.S. Baggett, R.M. Raphael, F.K. Kasper, A.G. Mikos, "Regulated non-viral gene delivery from coaxial electrospun fiber mesh scaffolds". *J. Controlled Rel.*, 143(1), 95 - 103, 2010.
- [26] G. Pados, A. Makedos, B. Tarlatzis, "Adhesion Prevention Strategies", de *Endoscopy*, S. Amornyotin, Ed., Greece, InTech, 2013, 49 - 72.
- [27] N. Bölgen, I. Vargel, P. Korkusuz, Y.Z. Menciloglu, E. Piskin, "In Vivo Performance of Antibiotic Embedded Electrospun PCL Membranes for Prevention of Abdominal Adhesions". *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 530 - 543, 2006.
- [28] G.E. Feresin, A. Tapia, M. Sortino, S. Zacchino, A.R. de Arias, A. Inchausti, G. Yaluff, J. Rodriguez, C. Theoduloz, G. Schmeda-Hirschmann, "Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*". *J. Ethnopharmacol*, 88, 241 - 247, 2003.
- [29] N. Radhakrishnan, A. Gnanamani, A.B. Mandal, "A potential antibacterial

- agent embelin, a natural benzoquinone extracted from *Embelia ribes*". *Biol. Med.*, 3,1 – 7, 2007.
- [30] D.W. Van Krevelen, *Properties of polymers*, Amsterdam: Elsevier, 1990, 121.
- [31] C. Hirschmugl, "Frontiers in infrared spectroscopy at surfaces and interfaces". *Surf. Sci*, 500, 507 - 604, 2002.
- [32] K. Merrett, R.M. Cornelius, W.G. McClung, L.D. Unsworth, H. Sheardown, "Surface analysis method for characterizing polymeric biomaterials" *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 13(6), 593 - 621, 2002.
- [33] G.A. Abraham, T.R. Cuadrado, "Métodos de caracterización de biomateriales", de *Biomateriales*, S. de Asa, J. S. Román. Sastre, Ed., Faenza, Italia, Faenza Editrice S.L., 2004, 173 - 196.
- [34] C. Hammond, *Introduction to Crystallography*. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks 19, Oxford: Oxford Science Publications, 1990.
- [35] J.M. Albella, A.M. Cintas, T. Miranda, J.M. Serratosa, *Introducción a la ciencia de materiales. Técnicas de preparación y caracterización.*, Madrid: C.S.I.C., 1993.
- [36] M.A. Llorente Ucena, A. Horta Zubiaga, *Técnicas de Caracterización de polímeros*, Madrid: UNED, 1991.
- [37] P. Louette, F. Bodino, J-J. Pireaux, "Poly(caprolactone) (PCL) XPS reference core level and energy loss spectra". *Surface Science Spectra*, 12, 27 - 31, 2005.
- [38] J.Z. Luk, J. Cooper-White, L. Rintoul, E. Taran, L. Grondahl, "Functionalised polycaprolactone films and 3D scaffolds via gamma irradiation induced grafting". *J. Mat. Chem. B*, 2013.

Capítulo 4

Estudio del proceso de liberación in vitro de embelina incorporada en matrices poliméricas micro/nanofibrosas

4.1. Introducción

El diseño y aplicación de sistemas de liberación controlada de agentes terapéuticos y de sistemas de dirección localizada es actualmente uno de los aspectos de mayor relevancia en el desarrollo de nuevas y mejores formas de medicación. La utilización de sistemas poliméricos para regular y dosificar la liberación de agentes bioactivos en aplicaciones específicas es una estrategia que ha adquirido gran interés y que requiere del aporte y trabajo conjunto de diversas disciplinas científicas (Fig. 4.1).



Fig. 4.1. Disciplinas científicas interrelacionadas con la liberación de agentes terapéuticos.

La liberación controlada de un agente terapéutico a partir de un sistema polimérico constituido por un polímero natural, sintético o una mezcla de ambos, se produce de manera tal que la liberación ocurre de un modo prediseñado, definiendo el método de distribución del agente y su farmacocinética. Esta liberación puede ser constante durante un largo período de tiempo, cíclica, o puede ser activada por el medio ambiente u otros eventos externos [1, 2, 3, 4]. En cualquiera de los casos, el objetivo del control de la

entrega del agente terapéutico consiste en lograr terapias más eficaces, eliminando posibilidades de intoxicación por sobredosis, manteniendo los niveles de agente terapéutico dentro de un rango deseado, permitiendo la disminución del número de administraciones y la utilización óptima del agente terapéutico.

La velocidad de liberación del agente terapéutico desde el sistema polimérico al medio está determinada por las propiedades del polímero, la interacción polímero/agente, y factores ambientales, como pueden ser el pH, la temperatura y los fluidos del organismo. La eficacia de un agente terapéutico en una aplicación específica requiere la disponibilidad de una determinada concentración del mismo, con la menor frecuencia posible de dosificación. Sin embargo, las técnicas convencionales, proporcionan un control muy pobre de las concentraciones del agente en plasma y, el tiempo de residencia sólo se puede aumentar si se hace lo mismo con la cantidad o frecuencia de las dosis. Ninguno de estos caminos es conveniente porque se puede superar el nivel mínimo de toxicidad, ocasionando con ello efectos nocivos para el organismo.

Los sistemas convencionales de dosificación pueden dar lugar a períodos alternativos de ineficacia o de toxicidad, hecho particularmente problemático si ambos niveles mínimos están muy próximos. En el caso ideal, el objetivo es conducir a la existencia de una concentración uniforme de agente terapéutico, emplear dosis más pequeñas y evitar efectos secundarios. La Fig. 4.2 muestra las curvas características de concentración de agente terapéutico en plasma, obtenidas por la administración a partir de la dosificación convencional o pastillas, un sistema de dosificación lenta y un sistema ideal de administración controlada.

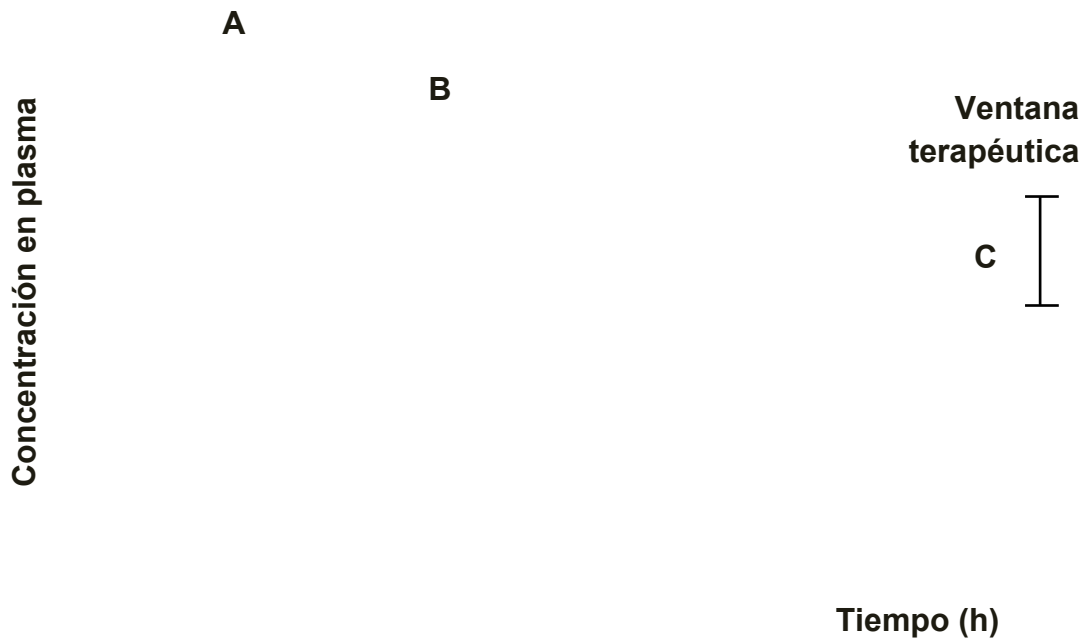


Fig. 4.2. Curvas típicas de concentración en plasma empleando, A) dosificación convencional, B) sistema de dosificación lenta, C) sistema ideal de liberación controlada de agentes terapéuticos.

4.1.1. Sistemas de liberación controlada

Los sistemas de liberación controlada son capaces de establecer un control temporal de la liberación, mientras que el control espacial permanece aún por resolver de manera efectiva en la mayoría de los casos. En cuanto al control temporal estos sistemas pueden ser de liberación prolongada, retardada, pulsátil y en lo que respecta al control espacial pueden ser sitio-específico y sistemas diana o vectorizados.

De acuerdo a los mecanismos de liberación, los sistemas de liberación controlada pueden agruparse en: sistemas controlados por difusión, sistemas controlados por activación del solvente, sistemas controlados por reacción química o enzimática y sistemas controlados por el ambiente fisiológico (respuesta a estímulos). A continuación se describen brevemente cada uno de estos sistemas.

4.1.1.1. Sistema de liberación controlada por difusión

La difusión se produce cuando el agente terapéutico disperso o contenido en un reservorio, se libera del polímero que forma el sistema de liberación controlada, tal como se observa en la Fig. 4.3. Esta forma de liberación se presenta en implantes, sistemas transdérmicos y dispositivos de administración oral, como sistemas matriciales (monolíticos).

La difusión puede producirse a escala macroscópica a través de poros en la matriz polimérica o en un nivel molecular, entre las cadenas de polímero. Con este mecanismo se han conseguido tiempos de liberación prolongados, como es el caso de cápsulas a base de dimetilsiloxano o copolímeros de etileno y acetato de vinilo para la liberación controlada de levonorgestrel, implantadas subdermicamente en la parte superior del brazo por períodos de hasta siete años con una cinética de orden cero.

La cinética de liberación del agente terapéutico está gobernada por sus propiedades físicas, particularmente por su peso molecular y su solubilidad en la matriz polimérica y en agua; por las propiedades físicas de la matriz; por su geometría; y por la cantidad de fármaco incorporado. La velocidad de difusión depende del área superficial y de la densidad de la membrana, así como de la solubilidad y del coeficiente de difusión del fármaco. Si hay suficiente fármaco para mantener una concentración interna mayor que la del medio externo, la velocidad de difusión del fármaco a través de la membrana se mantiene constante.

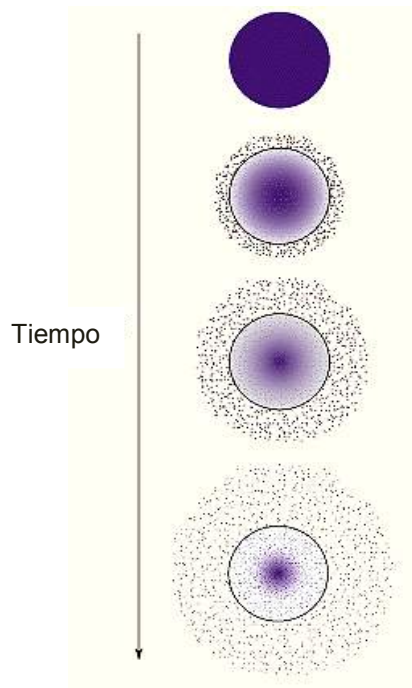


Fig. 4.3. Difusión de agentes terapéuticos a partir de una matriz polimérica

4.1.1.2. Sistema de liberación controlada por activación del solvente

En estos sistemas, la velocidad de liberación del agente terapéutico está controlada por la velocidad de difusión del medio acuoso hacia su interior. El sistema polimérico puede hincharse, generando canales o poros para la salida del agente, o en otros casos impulsarlo por un sistema osmótico que emplea membranas rígidas semipermeables, como es el caso de la bomba osmótica. Estos sistemas se han empleado en la administración de ibuprofeno, pseudoefedrina y nifedipina, entre otros. La Fig. 4.4 muestra un esquema de un sistema típico de liberación por activación del solvente.

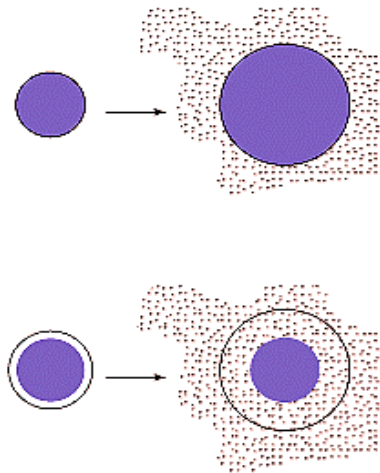


Fig. 4.4. Sistema de liberación de agentes terapéuticos por activación del solvente: sistema controlado por hinchamiento (superior) y sistema reservorio (inferior).

La bomba osmótica elemental consiste en un núcleo osmótico central que contiene el agente terapéutico, rodeado por una membrana semipermeable, con un orificio para la liberación (Fig. 4.5). El sistema se asemeja a una pastilla convencional, pero funciona por ósmosis; el fármaco extrae agua del tracto intestinal a través de la membrana semipermeable hacia el núcleo. El agua es absorbida a una velocidad controlada por la permeabilidad de la membrana al agua y por la actividad osmótica de la formulación del núcleo. Como la estructura de la membrana no permite que la pastilla aumente su volumen, la disolución de agente debe abandonar el interior de la pastilla a través del pequeño orificio al mismo tiempo que el agua entra por ósmosis. El sistema osmótico mantiene una velocidad de liberación de fármaco constante hasta que se disuelve por completo, a partir de ese momento la velocidad de liberación disminuye de forma predecible. Finalmente, la velocidad de liberación es independiente de los cambios de pH del tracto intestinal y la membrana inerte se excreta intacta.

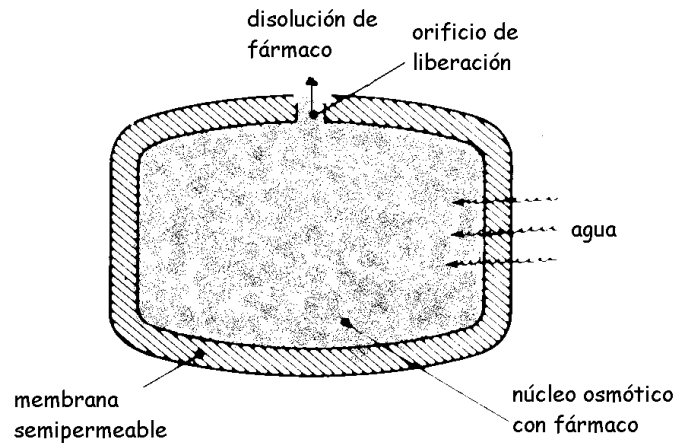


Fig. 4.5. Sección transversal de un sistema osmótico para administración oral.

4.1.1.3. Sistema de liberación controlada por reacción química o enzimática

En este caso la liberación del agente terapéutico está determinada por una reacción química de tipo hidrolítica o enzimática, que tiene lugar en polímeros biodegradables y biocompatibles, que se eliminan del organismo por rutas fisiológicas convencionales.

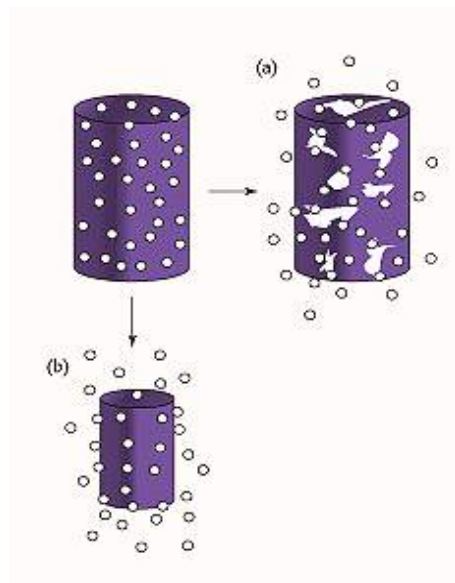


Fig. 4.6. Sistema de liberación controlada a partir de polímeros biodegradables: a) degradación en masa, b) erosión superficial

4.1.1.4. Sistema de liberación controlada por el ambiente fisiológico

Son aquellos sistemas formados por polímeros “inteligentes” [5] que responden súbitamente a modificaciones de las condiciones físicas o químicas en el ambiente con cambios pronunciados en sus propiedades. Los estímulos a los que responden los polímeros pueden ser:

Físicos: temperatura, fuerza iónica, campos eléctricos, mecánicos, presión, radiaciones sónicas y campos magnéticos.

Químicos: pH, iones específicos y agentes químicos.

Bioquímicos: sustratos de enzimas, ligandos afines y otros agentes biológicos.

Los polímeros con estas propiedades presentan una temperatura crítica mínima de solución de 32° C, como la poli(*N*-isopropilacrilamida). Se han desarrollado especialmente para uso en inyectables copolímeros tribloque biodegradables de poli(etilenglicol-*b*-(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico)) (PEG-PLGA-PEG y PLGA-PEG-PLGA), que gelifican térmicamente, permitiendo su administración en forma de soles y su posterior gelación en el interior del organismo.

Los polímeros sensibles al pH tienen importancia en la modificación de la liberación de agentes terapéuticos, debido a los diferentes pH presentes en el cuerpo que pueden modular su localización en lugares específicos en condiciones fisiológicas especiales, como el quitosano o hidrogeles de ácidos acrílicos. En este grupo se encuentran además los hidrogeles bioadhesivos, que forman enlaces de hidrógeno y asociaciones moleculares con la glicoproteína mucina, tales como el poli(ácido acrílico) ligeramente entrecruzado.

En la Fig. 4.7 se observa un sistema constituido por un hidrogel con respuesta a glucosa, basado en un sistema autorregulado sensible a un sustrato, atrapando en su superficie enzimas (glucosa oxidasa) que al estar en presencia del sustrato (glucosa) generan subproductos que alteran el pH circundante (ácido glucónico) y producen la liberación de insulina.

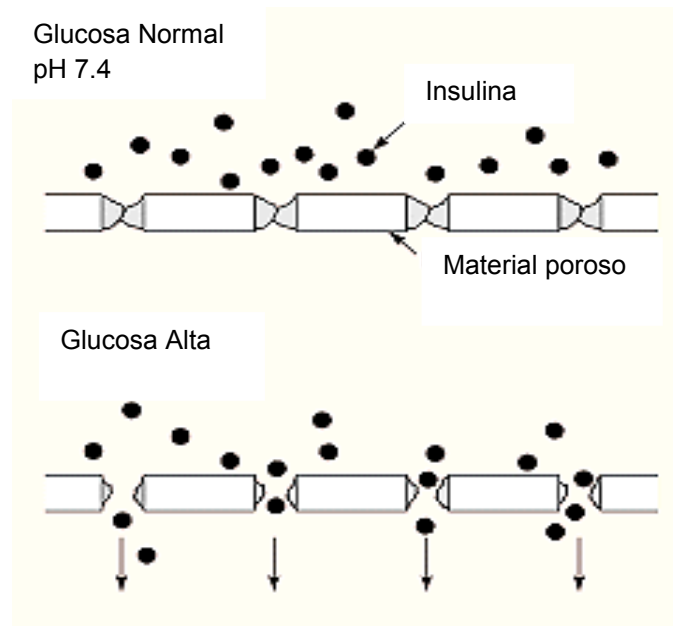


Fig. 4.7. Sistema de liberación controlada por ambiente fisiológico. Hidrogel con respuesta a glucosa.

4.1.2. Condiciones *sink*

Uno de los aspectos más importantes y más difíciles de la evaluación biofarmacéutica de un agente terapéutico consiste en la correlación cuantitativa de la absorción *in vivo*, respecto de la cinética de liberación *in vitro*. Levy y colaboradores reportaron el desarrollo de un ensayo de liberación *in vitro*, en el que la velocidad de liberación y la concentración de agente liberado se correlacionan cuantitativamente con la absorción gastrointestinal humana, empleando aspirina como agente terapéutico a partir de tres tipos diferentes de formas de dosificación [6]. Este estudio sin embargo, se limita a la liberación de agentes que son relativamente solubles en agua, presentándose mayores limitaciones en aquellos agentes parcialmente o poco solubles en medio acuoso. En cualquiera de los casos, la limitada tasa de absorción gastrointestinal implica que no existe acumulación de agente terapéutico en los fluidos gastrointestinales, situación conocida como condición *sink* o condición alejada de la saturación o de perfecta solubilidad del agente activo.

La condición *sink* se refiere a una concentración del agente terapéutico en medio de liberación que no exceda el 20 % del límite de solubilidad de dicho agente en ese medio. Si no se cumple esta condición en los ensayos de

liberación *in vitro*, los resultados tendrán poca o ninguna correlación con las observaciones de absorción *in vivo* [7].

Tal y como se mencionó anteriormente, los agentes terapéuticos con menor solubilidad en medio acuoso son los que presentan el mayor desafío en el diseño de un estudio adecuado de liberación *in vitro*. De modo que con frecuencia, resulta necesario emplear grandes volúmenes de medio de liberación y adoptar procedimientos de determinación analíticos con adecuada sensibilidad.

Se han propuesto en la literatura dos posibles estrategias para establecer condiciones *sink* en el medio de liberación. La primera consiste en el uso de una fase orgánica adicional que actúe como un reservorio del agente disuelto, o la adición de un adsorbente que permita disminuir la concentración de agente en medio acuoso [8]. La segunda, consiste en establecer condiciones de concentración del agente y volumen de medio acuoso acordes a las condiciones *sink*, siendo posible además la reposición de medio fresco luego de la extracción de pequeñas alícuotas de medio con agente disuelto [6]. Ambas estrategias implican el mismo principio, la eliminación de agente terapéutico disuelto del medio de disolución, de manera análoga a la eliminación de agente desde los fluidos gastrointestinales en el proceso de absorción *in vivo* [9].

4.1.3. Liberación inicial rápida

En muchos de los sistemas de liberación controlada, inmediatamente después de la colocación en el medio de liberación, ocurre una marcada liberación inicial de agente terapéutico antes que la velocidad de liberación alcance un perfil estable. Este fenómeno se denomina típicamente como liberación inicial rápida o *burst effect* [10]. Tal como se muestra en la Fig. 4.8, la liberación inicial rápida conduce a una entrega inicial mayor de agente terapéutico y por lo tanto se reduce el tiempo de vida efectivo del sistema. Debido a que la liberación inicial rápida ocurre en un tiempo muy breve en comparación con el tiempo total de liberación, no ha sido investigado específicamente y se ha ignorado en la mayoría de modelos matemáticos. Sin embargo, algunos trataron de encontrar los mecanismos por los que ocurre

esta liberación y evitarla tecnológicamente; mientras que otros incluyeron esta liberación inicial rápida en los modelos para simular el proceso de liberación. Por otro lado, la liberación inicial rápida se ha utilizado para administrar medicamentos a altas velocidades de liberación como parte de la estrategia de administración de agentes terapéuticos. Se ha demostrado que muchos agentes terapéuticos deben administrarse a diferentes velocidades, en algunos casos tales como los utilizados en el tratamiento de heridas, una liberación inicial proporciona un alivio inmediato seguido de liberación prolongada para promover la curación gradual [11].

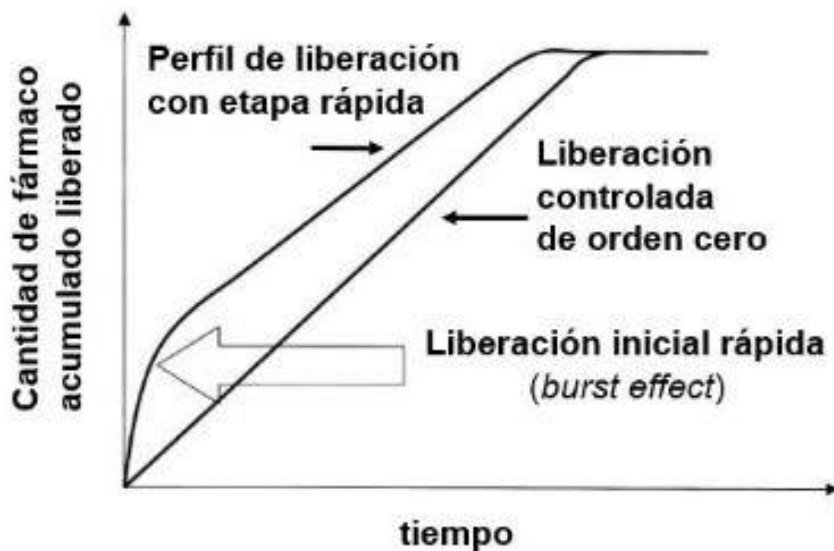


Fig 4.8. Liberación inicial rápida en un perfil de liberación

En varios procesos de administración pulsátil de agentes terapéuticos, la liberación rápida puede ser un objetivo, de modo que el agente se puede liberar rápidamente después de cambios en las condiciones ambientales que desencadenan la liberación. La mayoría de los trabajos publicados relacionados con la liberación inicial rápida son del campo farmacéutico. Estos se han centrado en estrategias para prevenir una liberación masiva, especialmente en sistemas con agentes de bajo peso molecular que son más propensos a tener perfiles de liberación rápida, debido a su tamaño molecular y a que las presiones osmóticas acentúan el gradiente de concentración. Además, altas velocidades de liberación inicial pueden conducir a concentraciones de fármaco cercanas o por encima del nivel tóxico *in vivo*, o

inducir una metabolización y excreción acelerada de los agentes disminuyendo su eficacia.

La liberación inicial rápida está relacionada con las condiciones de procesamiento de los sistemas, geometría del sistema, morfología y estructura porosa del sistema, características del material polimérico y del agente terapéutico, e interacción agente-material polimérico [10].

Aunque en algunos casos represente un efecto deseado, en general la liberación inicial rápida se considera un efecto negativo. Es por esto que se han estudiado y siguen estudiando estrategias que permitan minimizar o eliminar este fenómeno. Algunas de estas estrategias incluyen la disminución o eliminación del agente terapéutico de la superficie del sistema de liberación, empleando para ello recubrimientos tales como microesferas de doble pared con capas hechas de diferentes polímeros inertes o erosionables, y la modificación superficial de las matrices con agentes terapéuticos dispersos, a través de un recubrimiento externo con una capa de polímero igual o diferente al de la matriz. Sin embargo, las estrategias planteadas hasta el momento presentan limitaciones dado que implican procedimientos adicionales al procesamiento del sistema de liberación, que significan empleo de materiales adicionales, reducción de los niveles de carga de agente terapéutico y mayores costos de producción [10].

4.1.4. Modelos matemáticos de cinética de liberación

El estudio teórico de la cinética de liberación está relacionado con la comprensión e interpretación de los complejos fenómenos de liberación, que dependen entre otros factores de la composición química, cristalinidad, solubilidad, cantidad y tamaño de partícula, factores dependientes del medio de liberación, transporte de masa a través de la matriz polimérica, demás componentes, técnica de preparación. Resulta entonces un fenómeno difícil de modelizar intentando relacionar la cantidad de agente liberado (M) con el tiempo de liberación.

Los modelos que describen los mecanismos cinéticos de liberación se pueden agrupar en:

- a) Modelos matemáticos mecanicistas o reales, en los que la ecuación $M = f(t)$ tiene un sentido real y los parámetros que la constituyen se explican como resultado de un análisis teórico.
- b) Modelos matemáticos empíricos o no mecanicistas, basados en ecuaciones cuyo éxito reside en la capacidad para ajustar curvas experimentales.

La ventaja del uso de modelos matemáticos consiste en poder predecir el comportamiento del agente, lo que permite minimizar el número de experimentos necesarios y contribuir al desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.

Tal como se mencionó en la sección 4.1.1, los mecanismos cinéticos más importantes que regulan la velocidad de liberación controlada de un agente terapéutico son la difusión, el hinchamiento y la erosión. Los mecanismos de difusión pueden ser descritos empleando la segunda ley de Fick, lo que implica el conocimiento previo de la geometría del sistema a fin de determinar la modalidad de aplicación de esta ecuación.

Otro punto importante a considerar si la constante de difusión depende o no de la concentración del polímero. En aquellos casos en que la matriz presenta poca interacción con el fluido ingresante, es decir se expande poco, la difusión del agente terapéutico dependerá del fluido ingresante al sistema. En estos casos una buena aproximación es considerar que el fenómeno principal que afecta la velocidad de liberación es el gradiente de concentración y se considera la constante de difusión independiente de la concentración del polímero (primera ley de Fick) [12]. Para aquellos casos donde la matriz presenta una fuerte interacción con el fluido que ingresa, la expansión dependerá de las características fisicoquímicas del polímero, tales como su peso molecular, el grado de sustitución y la viscosidad. Por lo tanto, la difusividad del agente terapéutico dependerá del fluido ingresante y de las características de hinchamiento del polímero, proceso controlado por la segunda ley de Fick.

Los mecanismos de liberación pueden ser afectados además, por recubrimientos impermeables al medio. De manera tal, que estos recubrimientos pueden modificar las velocidades de relajación de las cadenas poliméricas afectando las dimensiones en la expansión, mientras que las

velocidades de difusión de los agentes permanecen inalteradas [13]. El desarrollo de este tipo de recubrimientos permitió la obtención de sistemas de liberación de tipo “tiempo de explosión controlada” en los que la liberación del agente comienza luego de un tiempo determinado. Estos tiempos donde no hay liberación pueden programarse, dependiendo del tipo de recubrimiento utilizado.

Finalmente, es preciso considerar los procesos fisicoquímicos relacionados con la solubilidad del agente terapéutico en el medio acuoso de liberación, pudiendo distinguirse tres casos [14]:

Agentes muy solubles ($> 5 \text{ mg.ml}^{-1}$): en este tipo de agentes, la disolución depende del tiempo de infiltración del medio en la matriz. Es decir el tiempo que tarda el medio en penetrar e hinchar la matriz polimérica.

Agentes poco solubles ($< 0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$): en este caso la liberación dependerá de la erosión de la matriz polimérica, dado que el agua que ingresa e hincha el polímero no alcanza para solubilizar el agente terapéutico. En estos casos, la velocidad de disolución depende mayoritariamente de las características de solubilidad del agente tales como, estado cristalino, estado iónico (polaridad), y tamaño de la partícula.

Agentes parcialmente solubles (entre $0,5$ y 5 mg.ml^{-1}): consiste en un comportamiento intermedio entre los anteriormente mencionados, es decir que la velocidad de liberación dependerá por un lado de la velocidad de infiltración e hinchamiento de la matriz, y por el otro de la velocidad de erosión de la matriz polimérica.

En este capítulo se estudia la liberación de embelina a partir de matrices electrohiladas de PCL, la embelina posee una solubilidad en medio acuoso de $130 \mu\text{g.ml}^{-1}$, por lo que puede considerarse un agente poco soluble.

Por todo lo mencionado puede establecerse que, los mecanismos involucrados en la liberación de los agentes terapéuticos resultan fuertemente dependientes de la composición y geometría del sistema de liberación. Se presentan a continuación algunos de los modelos matemáticos mecánicos más difundidos para el ajuste de las cinéticas de liberación controlada.

Modelo de orden cero: Este modelo surge de la base teórica desarrollada para el estudio cinético de las reacciones químicas, en las que el término “orden” de reacción se refiere a la forma en que la concentración de una sustancia influye en la velocidad de una reacción química, de manera que se denomina “cinética de orden cero” aquella en la que la velocidad es independiente de la concentración.

Para la aplicación de este modelo es necesario considerar que la velocidad de difusión del agente terapéutico es constante e independiente de la cantidad de agente disuelto, asumiendo que el área desde la que se libera el agente es constante. Es decir que el sistema polimérico no se hincha ni disgrega en el tiempo del proceso de liberación. La ecuación básica del modelo se expresa como:

$$\text{—} \tag{4.1}$$

donde M_t es la cantidad absoluta de agente terapéutico liberado al tiempo t ; M_∞ la cantidad total de agente terapéutico liberado a tiempo infinito, la que se corresponde con la cantidad total de agente inicialmente incorporado al sistema; A_S la cantidad inicial de agente en solución (que suele ser cero); y k la constante de velocidad.

Este modelo se emplea satisfactoriamente para el ajuste de datos de liberación obtenidos a partir de sistemas de tipo osmótico y reservorio, sin embargo se ha propuesto también para describir parcialmente la liberación de agentes desde sistemas matriciales.

Modelo de primer orden: En este modelo la velocidad de disolución es proporcional a la primera potencia de la concentración de agente disuelto:

$$\tag{4.2}$$

En general, este modelo resulta incapaz de ajustar los primeros datos de liberación, sin embargo ha sido empleado para el ajuste de cinéticas de

liberación, absorción y eliminación de algunos fármacos. Mulye y Turco desarrollaron un modelo basado en cinética de primer orden para el ajuste de la liberación de agentes altamente solubles desde matrices hidrofóbicas de diferentes geometrías [15, 16].

Modelo de Higuchi: Higuchi desarrolló probablemente una de las ecuaciones matemáticas más frecuentemente utilizadas para describir la velocidad de liberación de un agente terapéutico, a partir de un sistema polimérico matricial [17]. Si bien luego fue modificada y extendida para diferentes geometrías y características de las matrices, la ecuación básica del modelo propuesto es la siguiente:

$$\text{para} \quad (4.3)$$

que puede expresarse como la fracción de masa liberada:

$$(4.4)$$

siendo k , la constante de velocidad, donde M_t es la cantidad absoluta acumulativa de agente terapéutico liberado al tiempo t , A_{sup} el área superficial del sistema de liberación controlada, D es el coeficiente de difusión del agente en el medio matriz polimérica, C_o la concentración inicial del agente en el sistema matricial, C_s la solubilidad del agente en el medio polimérico, M_∞ la cantidad total de agente terapéutico liberado a tiempo infinito, la que se corresponde con la cantidad total de agente inicialmente incorporado al sistema, K_H es una constante que tiene en cuenta las variables de diseño del sistema y A es la fracción de liberación inicial. Las condiciones que deben tenerse en cuenta para aplicar este modelo son:

- a) La concentración inicial de agente terapéutico en el sistema es mucho mayor que la solubilidad de agente en el mismo (condición *sink*);

- b) El análisis matemático se basa en difusión unidimensional (de manera que se desprecia condiciones de contorno);
- c) El tamaño de partícula de agente terapéutico disperso en el sistema polimérico no es significativa frente al espesor del sistema;
- d) El hinchamiento y disolución del polímero son despreciables;
- e) La difusividad del agente es constante;
- f) En todo el proceso de liberación se mantiene la condición *sink*.

Este modelo se puede aplicar con mayor exactitud a matrices unidimensionales tales como películas poliméricas poco solubles que no sufran hinchamiento, y en donde el agente es muy soluble [14].

Modelo de Korsmeyer-Peppas: A partir de los años 70 se desarrollaron numerosos sistemas de liberación modificada con mecanismos basados en la difusión a través de matrices inertes o membranas, intercambio iónico, ósmosis, hinchamiento, etc. El ajuste de las cinéticas de liberación de estos sistemas mediante las ecuaciones planteadas hasta ese momento era con frecuencia inapropiado, resultando evidente que en numerosas ocasiones un solo mecanismo no era capaz de explicar el comportamiento de la liberación. Peppas y otros autores, desarrollaron un modelo que tiene en cuenta no sólo la difusión del agente terapéutico, sino también la relajación de las cadenas del polímero como determinantes de la liberación. En este modelo la dependencia de la velocidad de liberación con el tiempo se denomina también ley de potencia [18]:

(4.5)

donde K_{KP} es una constante que refleja las características estructurales y geométricas del sistema de liberación y n es el exponente de liberación, que indica el mecanismo de liberación que ocurre. Esta ecuación está limitada al ajuste de la primera parte de las curvas de liberación (60%), es decir para $Mt/M_{\infty} \leq 0,6$.

Esta ecuación puede analizarse como el resultado de la combinación de dos procesos aparentemente independientes: el transporte del agente terapéutico que obedece a las leyes de Fick, y el hinchamiento de la matriz que involucra la transición de un estado semirrígido a otro más flexible (transporte-caso II). De acuerdo a los valores de n , pueden identificarse los siguientes mecanismos de liberación:

Orden cero ($n = 1$): En este caso se dice que hay un hinchamiento controlado en la liberación del agente. El mecanismo que prevalece es el que corresponde al transporte caso II en polímeros, el cual considera la relajación de la matriz polimérica cuando el agua embebe el polímero, siendo ésta la responsable del control de la velocidad de liberación. El agua actúa en alguna medida como un plastificante, que disminuye la T_g . Cuando T_g es igual a la temperatura del medio de liberación, las cadenas del polímero experimentan una transformación de un estado cristalino a uno de tipo más flexible, con un incremento de volumen del polímero y aumento de la movilidad de las cadenas.

Difusión Fickiana ($n = 0,5$): Se refiere al caso en que la rapidez de penetración del medio acuoso es inferior a la velocidad de relajación de las cadenas poliméricas.

Difusión anómala ($0,5 < n < 1$): en este caso coexisten los mecanismos de difusión y expansión de la matriz polimérica, es decir que durante el proceso de hinchamiento, el fenómeno de difusión está simultáneamente acompañado por la relajación viscoelástica de las cadenas del polímero.

Difusión cuasi-Fickiana ($n < 0,5$): ocurre cuando la velocidad de penetración del medio acuoso es mucho menor que la velocidad de relajación de las cadenas del polímero.

Super caso tipo II ($n > 1$): se asocia a la presencia de poros en la matriz polimérica, que permite mayor área superficial e ingreso de medio acuoso, y que sirve como una vía para que el medio difunda a través de la matriz.

Estos valores del exponente de difusión n característicos para diferentes tipos de geometrías se presentan en la Tabla 4.1:

Tabla 4.1. Mecanismos de liberación difusional para sistemas no hinchables de diferente geometría

Filme	Cilindro	Esfera	Mecanismo de liberación
$n < 0,5$	$n < 0,45$	$n < 0,43$	<i>Difusión cuasi-Fickiana</i>
0,5	0,45	0,43	<i>Difusión Fickiana</i>
$0,5 < n < 1$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	<i>Difusión anómala</i>
1	0,89	0,85	<i>Transporte caso II</i>
$n > 1$	$n > 0,89$	$n > 0,85$	<i>Transporte súper caso II</i>

En este capítulo se estudian los procesos de liberación de embelina en medios con diferente pH a partir de sistemas preparados con distintos solventes y contenido de embelina. Se proponen algunas estrategias para modular los perfiles de liberación *in vitro* y al mismo tiempo disminuir el efecto de liberación inicial rápida en matrices electrohiladas de PCLE. Con este objetivo se preparan distintos sistemas multicapa que introduzcan barreras nanofibrasas a los procesos de disolución rápida de embelina superficial.

Finalmente se analiza la cinética de liberación de todos los sistemas matriciales efectuando el ajuste de las curvas de liberación con los modelos de orden cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas, a partir de los cuales se determinan y analizan los parámetros de ajuste y su relación con los mecanismos de difusión operantes.

4.2. Materiales

Poli(ϵ -caprolactona) de peso molecular promedio en peso $80 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ y embelina (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona). Los solventes empleados fueron diclorometano (DCM), metanol (MeOH) y *N,N*-dimetilformamida (DMF), obtenidos de Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA), los que se emplearon tal como se recibieron, sin purificación adicional.

4.3. Obtención de matrices poliméricas micro/nanofibrosas con embelina

4.3.1. Preparación de matrices fibrosas y filmes de PCLE

Las matrices fibrosas con embelina incorporada se prepararon siguiendo la metodología descrita detalladamente en la sección 3.3.1.2.

A los fines de comparar el efecto de la mezcla de solventes empleados durante el electrohilado en el comportamiento de la liberación de embelina, se emplearon las mezclas DCM:MeOH y DCM:DMF ambos en relación 1:1 en volumen en la preparación de soluciones con 5% p/v, para dar lugar a la formación de las matrices PCLE5A y PCLE5, respectivamente. Para estudiar el comportamiento de las matrices fibrosas con otro tipo de matrices se prepararon filmes mediante colada de soluciones (PCLf) (sección 3.3.2).

4.3.2. Preparación de matrices fibrosas multicapa

Se prepararon matrices electrohiladas multicapa tomando como base una matriz fibrosa con embelina (PCLE3) e incorporando una o dos capas de matriz electrohilada de PCL localizadas a uno o ambos lados de la matriz cargada con embelina. Las matrices fibrosas de PCL se prepararon a partir de soluciones en mezcla de solventes DCM:DMF (1:1) con concentración de PCL 18 % p/v, empleando $T = 20$ kV, $\Phi = 0,6$ ml.h⁻¹ y $d = 12$ cm, durante 6 h.

Se variaron los tiempos de electrohilado de PCL sobre matrices de PCLE3 de tal manera que se obtuvieron matrices bicapa y tricapa con dos espesores diferentes, obtenidos variando el tiempo de electrohilado, tal como se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Características de las matrices multicapa preparadas

Composición de la matriz	Nombre	Tiempo de electrohilado de cada capa adicional
PCLE3 / PCL10	Bicapa10	10 min
PCLE3 / PCL60	Bicapa60	60 min
PCL10 / PCLE3 / PCL10	Tricapa10	10 min
PCL60 / PCLE3 / PCL60	Tricapa60	60 min

4.3.3. Cuantificación de la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación de embelina

La cuantificación del contenido de embelina de las matrices electrohiladas se determinó mediante espectroscopía ultravioleta-visible, empleando un espectrofotómetro Agilent 8453 (Santa Clara, CA, USA).

Se disolvieron muestras circulares de 3 mm de diámetro en mezcla de solventes DCM:DMF (1:1), y posteriormente se determinaron los valores de absorbancia considerando la intensidad de la banda de absorción $\lambda = 296$ nm. Finalmente, se determinó su concentración a partir de la curva de calibración correspondiente de embelina en la mezcla de solventes mencionada ($R^2 = 0,989$). Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como valor medio \pm d.e. Las diferencias estadísticas entre los valores medidos, se determinaron mediante la aplicación de test de *Student* con un intervalo de confianza de 95 %.

La capacidad de carga (CC) se calculó mediante la ecuación 4.6

$$\text{---} \tag{4.6}$$

donde $(m_E)_f$ representa la masa de embelina incorporada en la matriz y $(m_m)_f$ es la masa de la matriz de PCLE.

La eficiencia de encapsulación (EE) se calculó como se muestra en la ecuación 4.7:

$$\frac{\text{---}}{\text{---}} \tag{4.7}$$

donde m_{Ef} representa la masa de embelina incorporada y m_{Ei} es la masa de embelina inicial, y m_{PCLf} y m_{PCLi} son las masas de PCL inicial y final.

La cuantificación de embelina presente en los sistemas poliméricos preparados y su liberación en los medios buffer PBS y PCB, requirió de la

preparación de soluciones de embelina de concentración conocida en ambos medios, para la obtención de las correspondientes curvas de calibración.

4.3.4. Determinación de la liberación de embelina

Los ensayos de liberación de embelina a partir de las matrices poliméricas electrohiladas, se realizaron en solución reguladora (*buffer*) fosfato (PBS, pH=7,4) y citrato (PCB, pH= 5,0). Los valores de pH de los medios de liberación se seleccionaron, considerando los posibles medios biológicos de interacción con las matrices electrohiladas con embelina.

Se cortaron discos de 10 mm de diámetro de las matrices fibrosas y se colocaron en frascos de vidrio, conteniendo 200 ml de solución reguladora a 37 °C y agitación de 150 rpm con agitador orbital. El número de extracciones no superó el 15 % del volumen total, y se efectuaron 30 extracciones de 1 ml con reposición de 1 ml de medio fresco cada una hora durante las primeras 12 h y posteriormente una muestra de 1 ml por día durante 18 días.

La concentración de embelina liberada se determinó mediante espectroscopia ultravioleta-visible, evaluando la intensidad de la banda de absorción a $\lambda = 330$ nm para PBS y $\lambda = 349$ nm para PCB. El porcentaje de embelina liberada se determinó dividiendo la cantidad de embelina liberada acumulada en cada tiempo de muestreo por la cantidad inicial de embelina.

4.4. Análisis del proceso de liberación de embelina en matrices micro/nanofibrosas

4.4.1. Contenido de embelina, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

En la Tabla 4.3 se muestran los valores correspondientes de masa de embelina presente en sistemas de PCLE por unidad de masa de muestra (M_E), la capacidad de carga, CC, y la eficiencia de encapsulación o carga de embelina incorporada en las matrices, EE.

Los valores de CC y EE del filme PCLfE5 y de la matriz electrohilada PCLE5 indican que las pérdidas de masa de embelina y PCL resultaron

menores durante el proceso de formación del filme. Esto puede atribuirse a que, durante el proceso de electrohilado, la evaporación del solvente puede llevar a la pérdida de masa de agentes terapéuticos que tengan una interacción atractiva con el mismo. Comparando las matrices de PCLE5A y PCLE5 (preparadas empleando DCM:MeOH y DCM:DMF) se observa que la capacidad de carga de embelina contenida en PCLE5A (4 %) es menor que en PCLE5 (5 %). Por otro lado, analizando los valores de eficiencia de encapsulación, PCLE5 (95 %) presentó mayor eficiencia que PCLE5A (83 %). Estos valores de eficiencia de encapsulación indican que, si bien la carga inicial de embelina es de 5 % p/p respecto de PCL, el uso de la mezcla de solventes DCM:DMF en la matriz PCLE5 permite una incorporación de embelina en la matriz fibrosa del 4,76 % p/p, respecto al 4,15 % p/p encontrado en PCLE5A. Esta mejora en la eficiencia de encapsulación refleja una mejor dispersión de embelina en la matriz de PCL. Por este motivo, como se comentó en el Capítulo 3, se seleccionó a la mezcla de solventes DCM:DMF para la preparación de matrices para los estudios posteriores (variación de la concentración de embelina y estructuras multicapa).

Por otro lado, los valores de capacidad de carga de las matrices PCLE5 (4,8 %), PCLE3 (2,8 %) y PCLE1,5 (1,4 %), indican que la cantidad de embelina contenida en estas matrices disminuyó con respecto a la cantidad inicial de embelina de la solución polimérica. Estos valores determinan que la incorporación de embelina en estas matrices fibrosas resultó de 4,76 % p/p para PCLE5, 2,89 % p/p para PCLE3, y 1,41 % p/p para PCLE1,5. Sin embargo, los valores de eficiencia de encapsulación no mostraron variaciones significativas (94 a 96%). Estos valores de eficiencia se encuentran en el orden de los publicados para fibras de PCL con timolol encapsulado para tratamiento de glaucoma (95,2 %) [19], y por encima de los reportados para fibras de PCL con factor de crecimiento nervioso (NGF) (88,6 %) y para fibras de PCL con captotecina para tratamiento de cáncer (59 %) [20, 21].

Tabla 4.3. Contenido de embelina incorporada en sistemas de PCLE por unidad de masa, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

Matriz	ME (± d.e.) (mg.g⁻¹)	CC (± d.e.) (%)	EE (± d.e.) (%)
PCLfE5	48,55 ± 0,77	4,86 ± 0,12	98,00 ± 0,03
PCLE5A	40,14 ± 0,69	4,01 ± 0,15	83,00 ± 0,05
PCLE5	48,00 ± 0,61	4,80 ± 0,12	95,14 ± 0,03
PCLE3	27,58 ± 0,41	2,76 ± 0,11	96,32 ± 0,03
PCLE1,5	13,94 ± 0,59	1,39 ± 0,12	94,26 ± 0,02
Bicapa10	13,85 ± 0,45	1,38 ± 0,11	96,32 ± 0,03
Bicapa60	9,34 ± 0,57	0,93 ± 0,11	96,32 ± 0,04
Tricapa10	7,72 ± 0,34	0,77 ± 0,12	96,32 ± 0,03
Tricapa60	5,75 ± 0,23	0,58 ± 0,11	96,32 ± 0,04

Dado que la matriz de PCLE3 presentó la mayor eficiencia de encapsulación y una capacidad de carga tal que implica la incorporación casi completa de la embelina presente en la solución polimérica inicial, se seleccionó esta matriz como base para la preparación de matrices bicapa y tricapa.

Finalmente, los valores de capacidad de carga de las matrices multicapa indican, como era de esperar, que la cantidad de embelina en las matrices disminuye con el incremento del número de capas de matriz polimérica. Esto se debe justamente al incremento de la masa producido por la incorporación de cada capa fibrosa adicional. Lógicamente, los valores de eficiencia de encapsulación de las matrices bicapa y tricapa permanecen constantes e iguales a los de la matriz de PCLE3 (96 %).

4.4.2. Estudio del proceso de liberación de embelina

4.4.2.1. Efecto del solvente de electrohilado y del pH del medio de liberación

Los solventes o mezclas de solventes empleados en la preparación de soluciones para electrohilado influyen y determinan varios aspectos del proceso. La solubilidad de las cadenas poliméricas y del agente terapéutico, la facilidad del transporte de la carga y la velocidad de solidificación del microchorro dependen de propiedades del solvente (momento dipolar,

conductividad) y determinan la obtención o no de fibras electrohiladas, así como también el tamaño de las mismas. Cuanto menor es la temperatura de ebullición del solvente mayor es la velocidad de solidificación del microchorro. Sin embargo, en ocasiones la solidificación puede ser muy rápida produciendo una obstrucción en la boquilla. Por otra parte cuando la temperatura de ebullición es muy elevada, las fibras alcanzan el colector con una cantidad considerable de solvente, que por disolución pierden su morfología formando un film. El empleo de mezclas de solventes de bajo y alto punto de ebullición permite balancear esta situación.

En la Fig. 4.9 y 4.10 se muestran los perfiles de liberación de embelina en PBS y PCB ambas a 37°C de matrices de PCLE5A y PCLE5, preparadas con DCM:MeOH y DCM:DMF respectivamente.

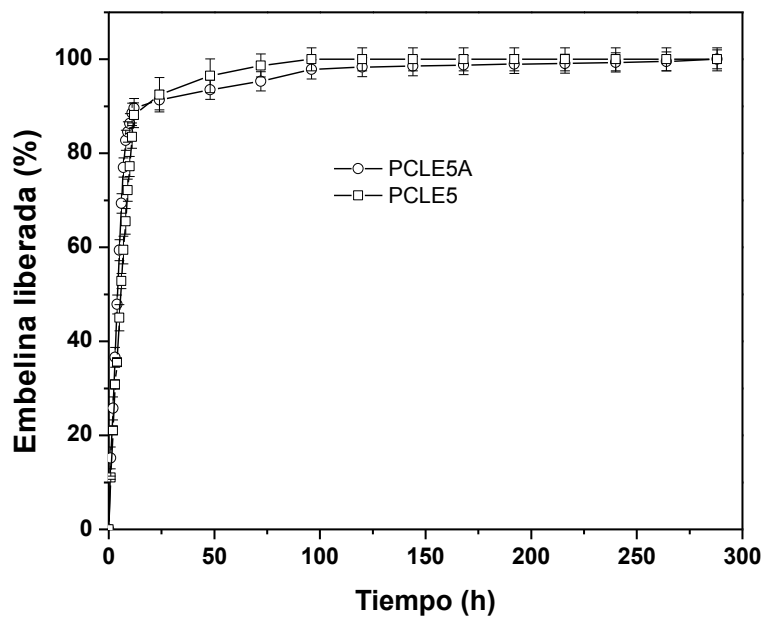


Fig. 4.9. Perfiles de liberación de embelina en PBS (pH = 7,4) de matrices de PCLE obtenidas con distinta mezcla de solventes: PCLE5A (DCM:MeOH) y PCLE5 (DCM:DMF) ambos 1:1

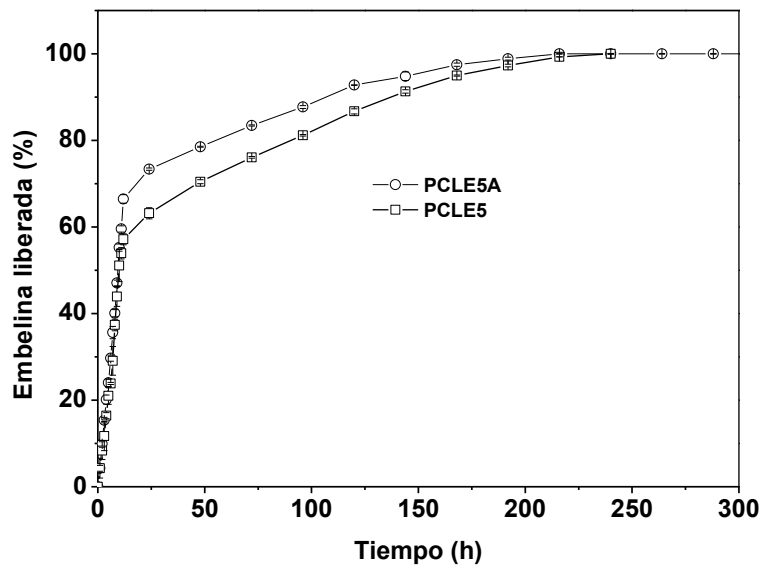


Fig. 4.10. Perfiles de liberación de embelina en PCB (pH = 5) de matrices de PCLE obtenidas con distinta mezcla de solventes: PCLE5A (DCM:MeOH) y PCLE5 (DCM:DMF) ambos 1:1

Los perfiles de liberación de las matrices de PCLE5A y PCLE5 en ambos medios mostraron que la embelina puede liberarse de las matrices de PCL a la solución acuosa. La degradación del PCL no está involucrada en el proceso de liberación de embelina, dado que la PCL posee un tiempo de degradación hidrolítica mucho mayor que la duración del estudio de liberación *in vitro*. El proceso de liberación presentó dos etapas marcadamente diferentes. La primera etapa consiste en una liberación inicial rápida, en la cual la liberación ocurre por disolución de embelina presente en la superficie y regiones próximas a la superficie de la matriz. En este fenómeno se excluye el hinchamiento de la matriz, debido a que la absorción del medio por parte de la PCL en 10 h es inferior a 0,5 %. La segunda etapa consiste en una fase de liberación lenta, asociada a mecanismos difusivos de las moléculas de embelina presentes en el interior de las nanofibras y de la matriz.

Los perfiles de liberación de embelina de PCLE5 en PBS mostraron una etapa inicial de orden cero durante 12 h en donde se liberó un 88% de la embelina total de la matriz, alcanzando la liberación completa a las 96 h (4 días). La matriz de PCLE5A presentó algunas diferencias en el perfil de

liberación de embelina en PBS revela que la etapa inicial de orden cero se mantuvo hasta las 8 h (83 %), alcanzando la liberación completa asintóticamente desde las 120 h (5 días) hasta los 12 días. En resumen, si bien PCLE5 presentó a las 12 h una liberación acumulada muy similar a PCLE5A, la región de orden cero mostró una liberación más atenuada, pero al mismo tiempo completando la liberación en menor tiempo.

Realizando el mismo análisis en PCB, para PCLE5 la etapa inicial se también se prolongó hasta las 12 h (66 %), mientras que la liberación completa se produjo a los 10 días. En el caso de PCLE5A, la liberación inicial hasta las 12 h resultó menor (57 %), completando la liberación también en 10 días.

En base a estos resultados, la etapa inicial de liberación rápida presentó una evidente dependencia del pH en ambos tipos de matrices, siendo más atenuada en su etapa inicial en PCB y al mismo tiempo más prolongada.

La mezcla de solventes DCM:DMF empleada en PCLE5 resultó entonces más apropiada para la obtención de perfiles de liberación con menor liberación inicial.

4.4.2.1.1. Análisis de la cinética de liberación

Las Fig. 4.11 a 4.14 muestran los ajustes realizados en las dos regiones que presentaron las curvas de liberación: una etapa de liberación inicial de orden cero y una segunda etapa de liberación difusional, en donde se aplicaron los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas. En la Tabla 4.4 se resumen los resultados de las constantes y parámetros de los modelos y el coeficiente de correlación (R^2). La constante A indica la cantidad de embelina liberada en el tiempo de inicio de la etapa difusional (t), K_H es la constante de Higuchi (ecuación 4.4) y K_{KP} es la constante de Korsmeyer-Peppas y el exponente difusional n (ecuación 4.5).

Tabla 4.4: Resultados del ajuste de las curvas de liberación de matrices de PCLE5A y PCLE5 en PBS (pH = 7.4) y PCB (pH = 5)

PBS	Etapa 1 (Orden cero)			Modelo de Higuchi		Modelo de Korsmeyer-Peppas		
	A (%)	t (h)	R ²	KH (h ^{-1/2}) (d.e.)	R ²	K _{KP} (h ⁻ⁿ) (d.e.)	n (d.e.)	R ²
PCLE5A	82,77	8	0,989	1,226 (0,063)	0,795	4,087 (0,399)	0,264 (0,019)	0,968
PCLE5	88,11	12	0,989	1,334 (0,022)	0,996	1,385 (0,213)	0,491 (0,037)	0,994
PCB								
PCLE5A	66,48	12	0,995	2,388 (0,041)	0,988	1,746 (0,256)	0,564 (0,029)	0,992
PCLE5	57,16	12	0,986	2,854 (0,068)	0,975	1,526 (0,253)	0,625 (0,068)	0,990

En la etapa de liberación difusional, el modelo de liberación de Korsmeyer-Peppas mostró un ajuste mucho mejor que el modelo de Higuchi (columnas sombreadas en Tabla 4.4) para ambos tipos de matrices y ambos pH. Dependiendo de los valores del exponente n para filmes se explican diferentes casos de transporte. La liberación de embelina en PCLE5A resultó cuasi-Fickiana en PBS, asociado a la presencia de poros en la matriz formados como consecuencia de la evaporación del solvente o cavidades dejadas por la liberación de embelina, con difusión simultánea a través de los poros llenos del medio de disolución. Mientras que en PCLE5 la difusión resultó Fickiana ($n = 0.491$) y en consecuencia el modelo de Korsmeyer-Peppas equivale al modelo de Higuchi (modelo de la raíz cuadrada).

El mecanismo de transporte en PCB resultó de tipo difusión anómala para ambas matrices. En este caso el mecanismo de difusión se desvía de la difusión Fickiana, en donde existe un término de contribución Fickiana ($K_1t^{0.5}$) y un término de orden cero (K_2t).

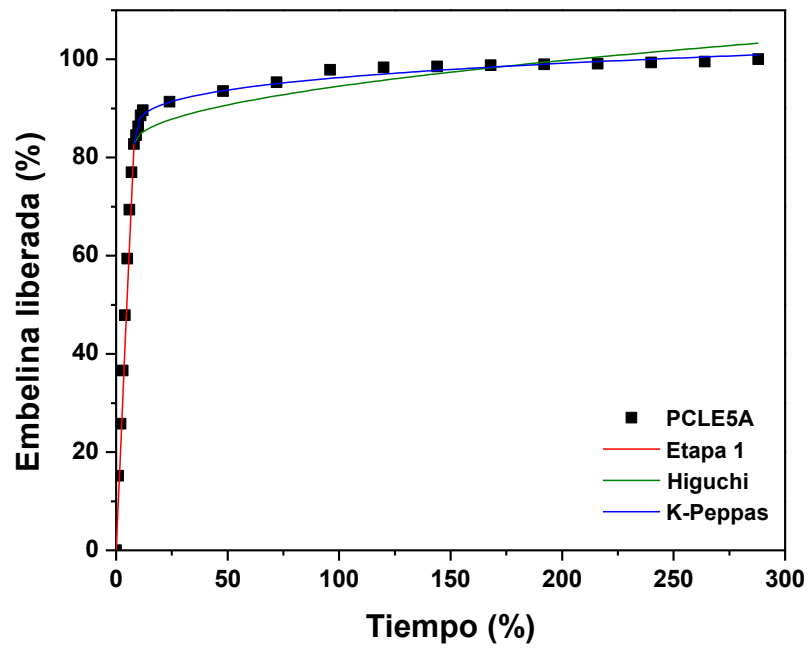


Fig. 4.11. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE5A en PBS (pH = 7,4)

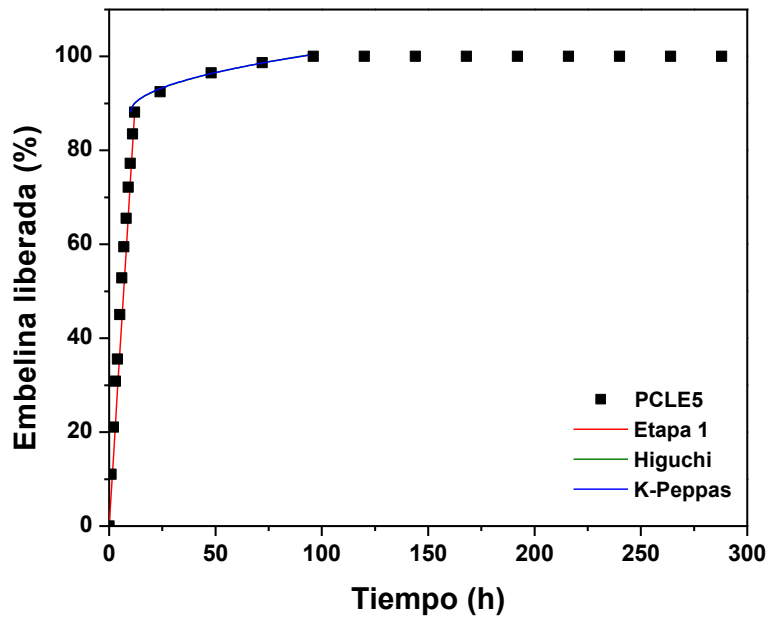


Fig. 4.12. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE5 en PBS (pH = 7,4)

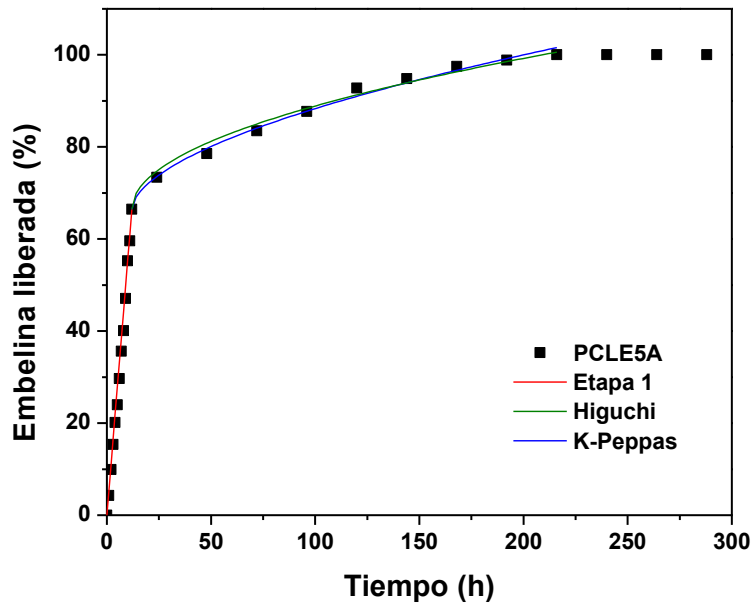


Fig. 4.13. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE5A en PCB (pH = 5)

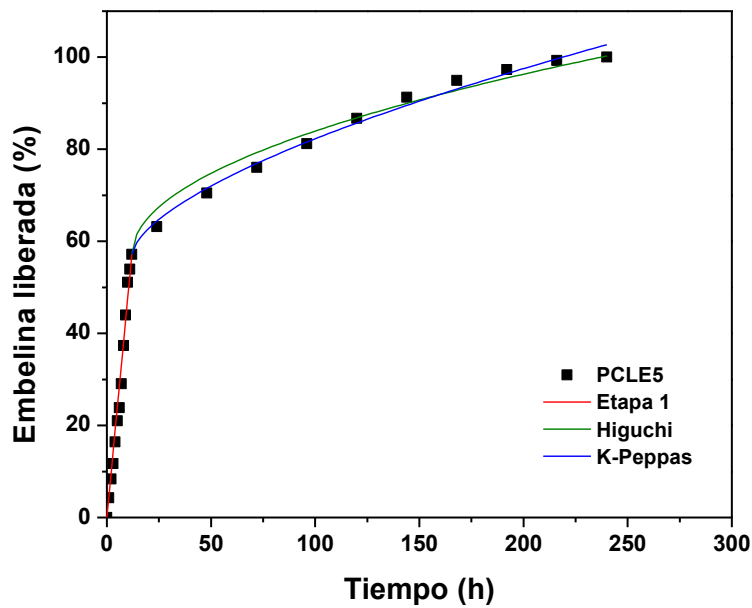


Fig. 4.14. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE5 en PCB (pH = 5).

4.4.2.2. Efecto de la concentración de embelina y del pH

Para investigar el efecto de la concentración de embelina en los sistemas matriciales PCLE, se prepararon matrices con 1,5 y 3% p/p de embelina, las que junto con la matriz de 5 % ya estudiada conforman la serie PCLE5, PCLE3 y PCLE1,5. En las Fig. 4.15 y 4.16 se muestran los perfiles de liberación de embelina de estas matrices en PBS y PCB respectivamente. Los perfiles muestran nuevamente dos etapas bien marcadas. La disminución de la concentración de embelina condujo, como era de esperar, a una disminución de la liberación inicial de orden cero. Los valores se resumen en la Tabla 4.5.

En PCB la liberación inicial de embelina resultó menor a la observada en PBS. Estos resultados indican que la liberación inicial de embelina es fuertemente dependiente del pH del medio y la solubilidad del principio activo en esas condiciones. El proceso de liberación resultó más prolongado con la disminución de la concentración de embelina.

Los resultados muestran que el perfil de liberación del sistema se puede modular dentro de ciertos límites dependiendo del contenido de embelina presente en las matrices nanofibrosas.

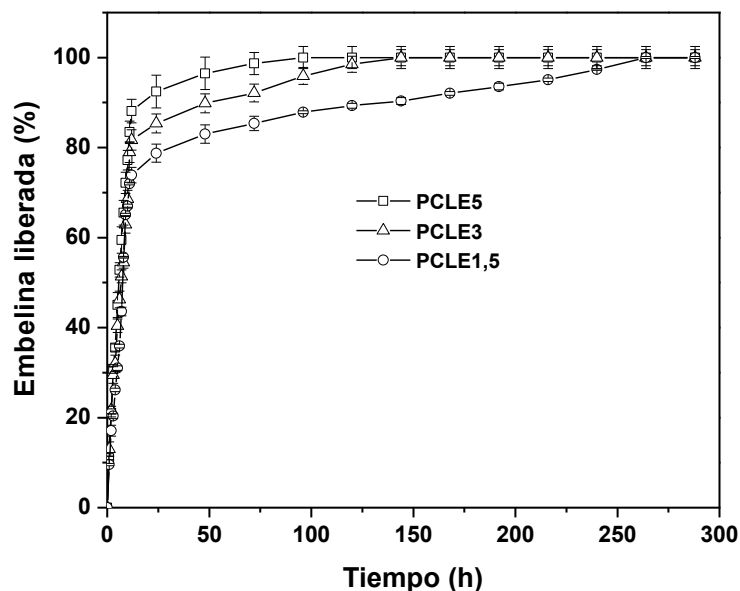


Fig. 4.15. Perfiles de liberación de embelina en PBS (pH = 7,4) de matrices con distinto contenido de embelina: PCLE5, PCLE3 y PCLE1,5.

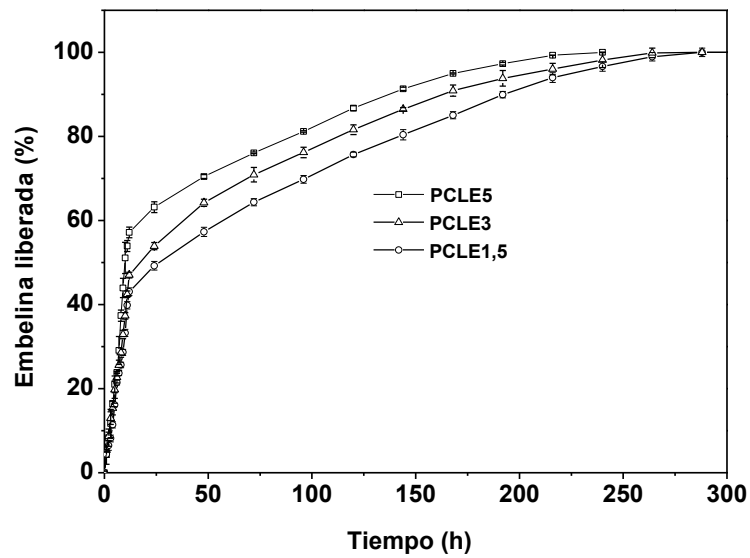


Fig. 4.16. Perfiles de liberación de embelina en PCB (pH = 5) de matrices con distinto contenido de embelina: PCLE5, PCLE3 y PCLE1,5.

4.4.2.2.1. Análisis de la cinética de liberación

Las Fig. 4.17 a 4.20 muestran los ajustes realizados en las dos regiones de las curvas de liberación. Tal como se procedió en la sección 4.4.2.1.1, las curvas se ajustaron con una etapa de orden cero y una etapa de liberación difusional en donde se aplicaron los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas. En la Tabla 4.5 se resumen los resultados de las constantes y parámetros de los modelos y el coeficiente de correlación.

Tabla 4.5: Resultados del ajuste de las curvas de liberación de matrices de PCLE en PBS (pH = 7.4) y en PCB (pH = 5)

PBS	Etapa 1 (Orden cero)			Modelo de Higuchi		Modelo de Korsmeyer-Peppas		
	A (%)	t (h)	R ²	K _H (h ^{-1/2}) (d.e.)	R ²	KKP (h ⁻ⁿ) (d.e.)	n (d.e.)	R ²
PCLE5	88,11	12	0.989	1,334 (0,022)	0,996	1,385 (0,213)	0,491 (0,037)	0,994
PCLE3	68,59	10	0.979	2,994 (0,227)	0,780	9,737 (0,766)	0,231 (0,018)	0,984
PCLE1,5	67,00	10	0.981	2,058 (0,052)	0,945	4,359 (0,372)	0,354 (0,016)	0,990
PCB								
PCLE5	57,16	12	0,986	2,854 (0,068)	0,975	1,526 (0,253)	0,625 (0,068)	0,990
PCLE3	47,02	12	0,994	3,332 (0,051)	0,986	2,569 (0,389)	0,550 (0,051)	0,988
PCLE1,5	43,04	12	0,987	2,389 (0,041)	0,988	1,746 (0,256)	0,564 (0,030)	0,992

En la etapa de liberación difusional, el modelo de liberación de Korsmeyer-Peppas mostró un ajuste mucho mejor que el modelo de Higuchi (columnas sombreadas en Tabla 4.5) para ambos tipos de matrices y ambos pH. En las matrices PCLE3 y PCLE1,5 la liberación de embelina en PBS resultó cuasi-Fickiana y en PCB presentó un mecanismo de transporte anómalo.

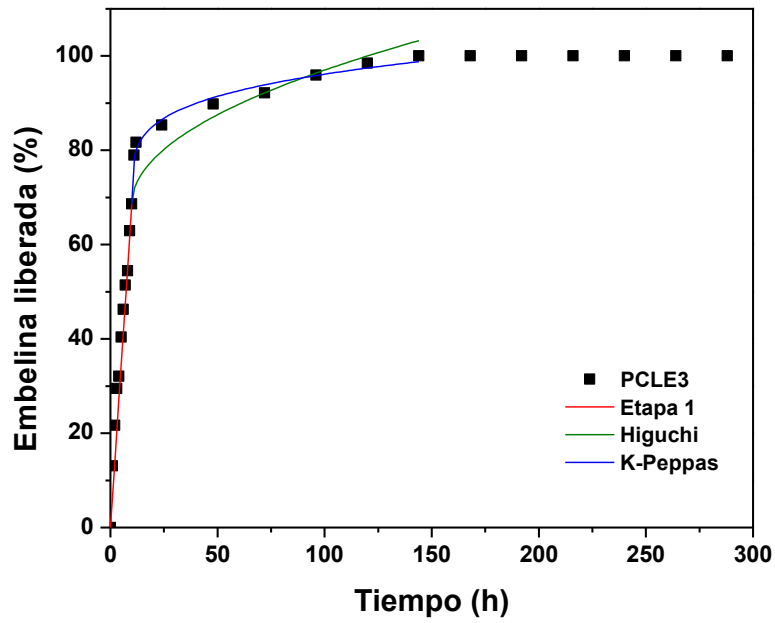


Fig. 4.17. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE3 en PBS (pH = 7,4)

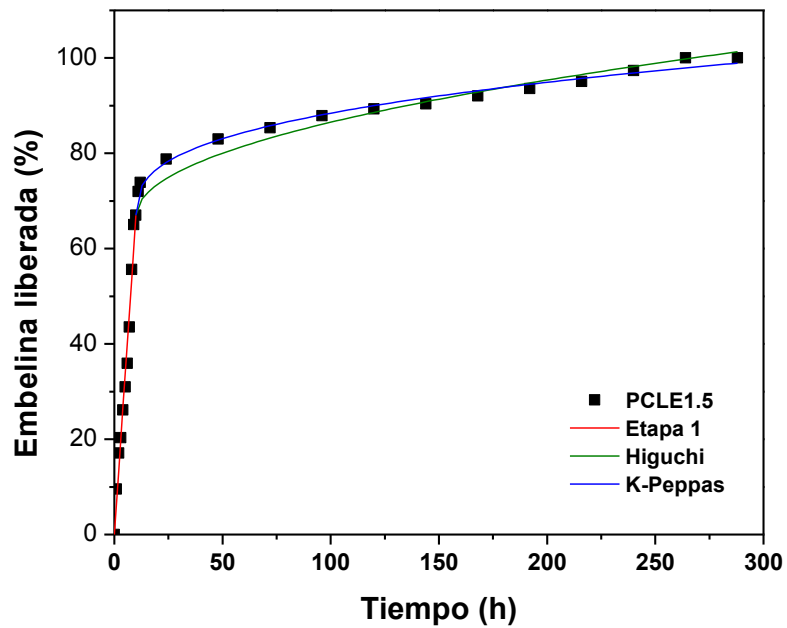


Fig. 4.18. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE1,5 en PBS (pH = 7,4)

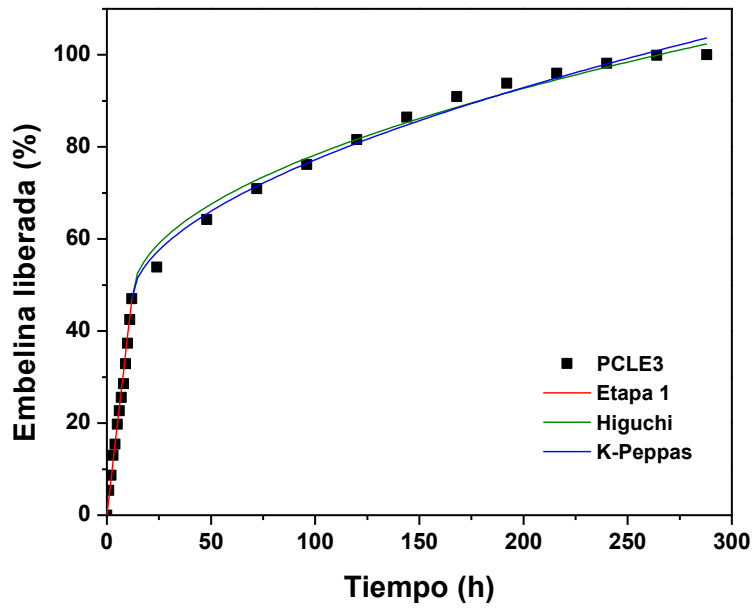


Fig. 4.19. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE3 en PCB (pH = 5)

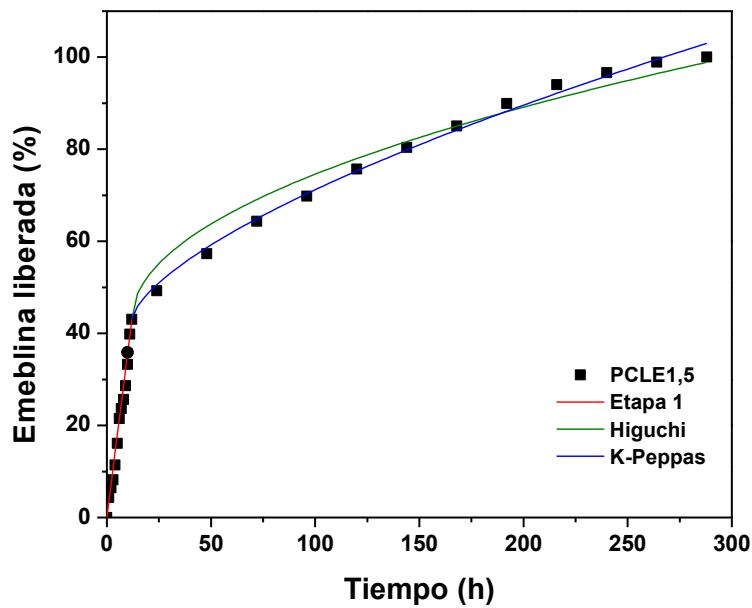


Fig. 4.20. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz de PCLE1,5 en PCB (pH = 5)

4.4.2.3. Efecto de la estructura multicapa y del pH

En las Fig. 4.21 a 4.24 se muestran los perfiles de liberación de embelina en PBS y PCB ambas a 37°C de matrices de PCLE3 y sus modificaciones.

El análisis de los perfiles de liberación se realizó siguiendo el mismo tipo de procedimiento realizado en las secciones anteriores. El contenido de embelina en todas estas matrices es constante y la introducción de capas sobre la matriz base condujo a una disminución de la cantidad liberada en la etapa inicial, en el orden bicapa 10, bicapa60, tricapa10 y tricapa60 (Tabla 4.6) tanto en PBS como en PCB. A este efecto se suma el incremento del tiempo de liberación.

Los resultados muestran que se puede modular el perfil de liberación del sistema dependiendo del número y espesor de capas introducidas en la matriz base que actúa como reservorio de embelina.

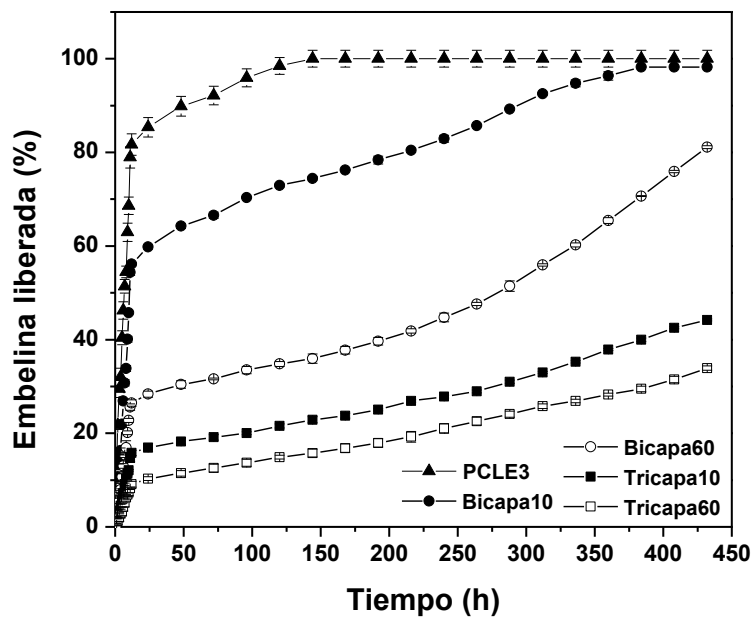


Fig. 4.21. Perfiles de liberación de embelina en PBS (pH = 7,4) de matrices de PCLE3, bicapa10, bicapa60, tricapa10 y tricapa60

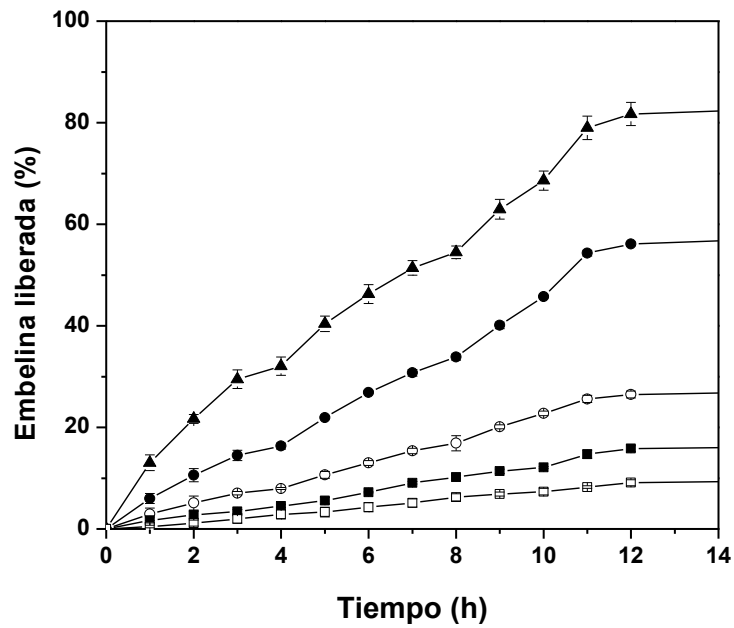


Fig. 4.22. Perfiles de liberación de embelina en PBS (pH = 7,4) de matrices de PCLE3, bicapa10, bicapa60, tricapa10 y tricapa60, mostrando la zona de las primeras 14 h de liberación.

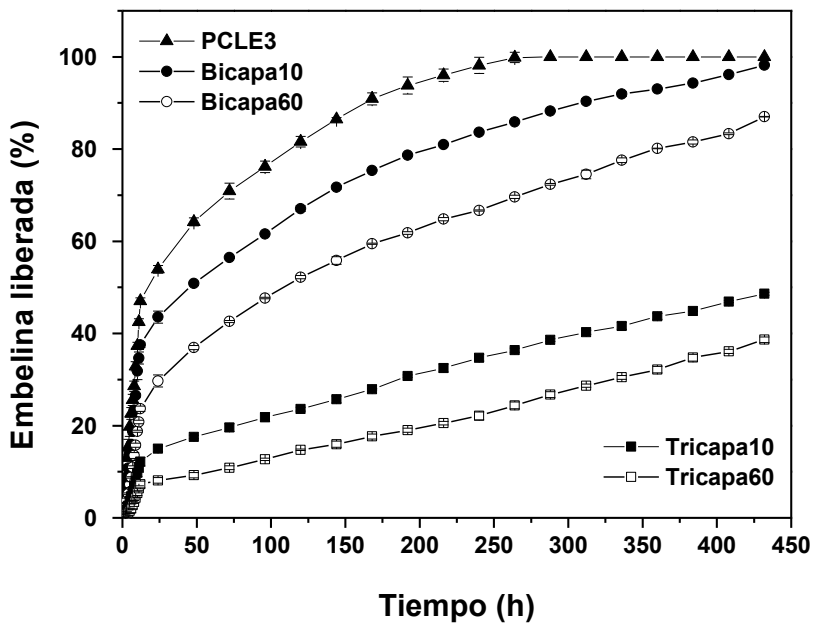


Fig. 4.23. Perfiles de liberación de embelina en PCB (pH = 5) de matrices de PCLE3, bicapa10, bicapa60, tricapa10 y tricapa60

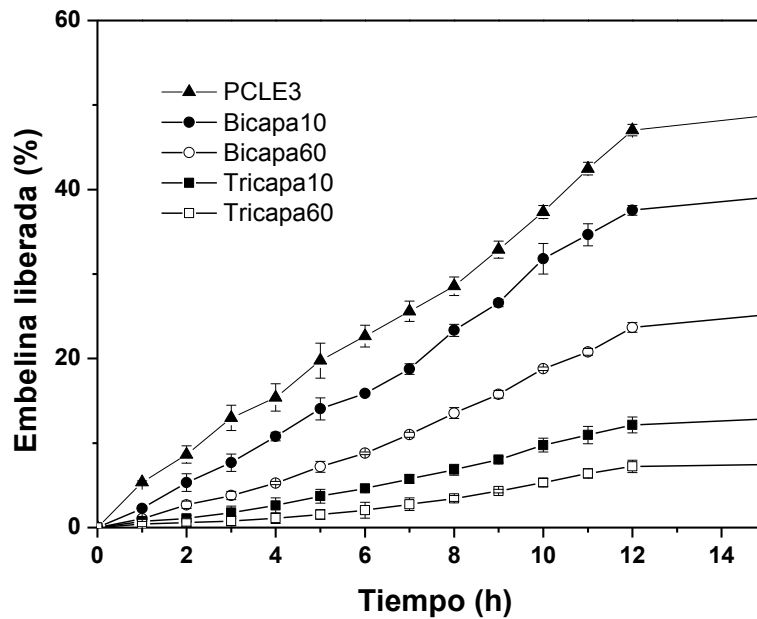


Fig. 4.24. Perfiles de liberación de embelina en PCB (pH = 5) de matrices de PCLE3, bicapa10, bicapa60, tricapa10 y tricapa60, mostrando la zona de las primeras 14 h de liberación.

4.3.2.3.1. Análisis de la cinética de liberación

Las Fig. 4.25 a 4.32 muestran los ajustes realizados en las curvas de liberación y en la Tabla 4.6 se resumen las constantes y parámetros de los modelos y el coeficiente de correlación.

La matriz bicapa10 mostró una segunda etapa de liberación difusional que se pudo ajustar parcialmente con el modelo de Korsmeyer-Peppas en PBS hasta las 225 h, tiempo a partir del cual se desarrolló una tercera etapa que se ajustó a una cinética de orden cero hasta su finalización. Esta situación resultó diferente en PCB donde la curva de liberación se ajustó en todo el rango con el modelo de Korsmeyer-Peppas.

La matriz bicapa60 también presentó el mismo comportamiento en PBS, una segunda etapa difusional según el modelo de Korsmeyer-Peppas y una tercera etapa de orden cero, y en PCB, donde todo el rango se ajustó exactamente con Korsmeyer-Peppas (n cercano a 0,5) que se corresponde con el modelo de Higuchi. Esta configuración difiere de la presente en un sistema de liberación transdermal en el cual solamente una cara del dispositivo es la

que puede efectuar la liberación. Las dos caras de ambas matrices bicapa exhibieron liberación de embelina, por lo tanto la matriz nanofibrosa de PCL no constituyó una barrera impermeable al proceso de liberación.

En el caso de la matriz tricapa10, a pesar de poseer la matriz de PCLE3 recubierta en ambas caras con una matriz nanofibrosa de PCL, también presentó una segunda etapa difusional según el modelo de Korsmeyer-Peppas y una tercera etapa de orden cero, aunque en PCB la segunda etapa resultó se ajustó con Korsmeyer-Peppas (n cercano a 1) que se corresponde con el modelo de liberación de orden cero hasta completar la liberación.

Finalmente en la matriz tricapa60 presentó, en ambos medios, una segunda etapa difusional que se ajustó con Korsmeyer-Peppas (n cercano a 1) que se corresponde con el modelo de liberación de orden cero hasta completar la liberación. Peppas definió este comportamiento como transporte no Fickiano o transporte caso II.

Esta configuración multicapa posee el espesor suficiente como para producir un sistema de liberación controlada que exhibe un perfil en el cual la cantidad de agente liberado en el tiempo (velocidad de disolución) es constante, tal como lo expresa la ecuación 4.1. Es decir que estamos frente a particular sistema de liberación de tipo reservorio, en donde el agente bioactivo está contenido en un núcleo que está rodeado por una membrana polimérica, y que es liberado a través de esta membrana que ejerce un control sobre el proceso de liberación.

Tabla 4.6: Resultados del ajuste de las curvas de liberación de matrices de PCLE bicapa y tricapa en PBS (pH = 7.4)

PBS	Etapa 1 (Orden cero)			Modelo de Higuchi		Modelo de Korsmeyer-Peppas		
	A (%)	t (h)	R ²	K _H (h ^{-1/2}) (d.e.)	R ²	KKP (h ⁻ⁿ) (d.e.)	n (d.e.)	R ²
Bicapa10	45,75	10	0,990	2,538 (0,105)	0,905	6,676 (0,666)	0,299 (0,021)	0,983
Bicapa60	22,76	10	0,994	1,224 (0,034)	0,967	1,445 (0,342)	0,466 (0,048)	0,965
Tricapa10	12,09	10	0,991	0,957 (0,034)	0,941	1,494 (0,380)	0,408 (0,052)	0,945
Tricapa60	9,05	12	0,996	0,908 (0,049)	0,856	0,029 (0,006)	1,110 (0,034)	0,994

PBS	Etapa 2 (Orden cero)			Etapa 3 (Orden cero)		
	t _o (h)	t _f (h)	R ²	t _o (h)	t _f (h)	R ²
Bicapa10	-	-	-	182	384	0,989
Bicapa60	-	-	-	240	432	0,967
Tricapa10	-	-	-	264	432	0,994
Tricapa60	12	432	0,995	-	-	-

Tabla 4.7: Resultados del ajuste de las curvas de liberación de matrices de PCLE bicapa y tricapa en PCB (pH = 5)

PCB	Etapa 1 (Orden cero)			Modelo de Higuchi		Modelo de Korsmeyer-Peppas		
	A (%)	t (h)	R ²	K _H (h ^{-1/2}) (d.e.)	R ²	K _{KP} (h ⁻ⁿ) (d.e.)	n (d.e.)	R ²
Bicapa10	26,57	9	0,993	3,655 (0,037)	0,990	5,421 (0,267)	0,429 (0,008)	0,997
Bicapa60	15,76	9	0,982	3,411 (0,010)	0,999	3,535 (0,113)	0,493 (0,006)	0,999
Tricapa10	8,02	9	0,980	1,806 (0,032)	0,976	0,766 (0,092)	0,653 (0,021)	0,993
Tricapa60	4,31	9	0,936	1,354 (0,051)	0,910	0,133 (0,027)	0,912 (0,035)	0,989

PCB	Etapa 2 (Orden cero)			Etapa 3 (Orden cero)		
	t _o (h)	t _f (h)	R ²	t _o (h)	t _f (h)	R ²
Bicapa10	-	-	-	-	-	-
Bicapa60	-	-	-	-	-	-
Tricapa10	24	432	0,994	-	-	-
Tricapa60	12	432	0,998	-	-	-

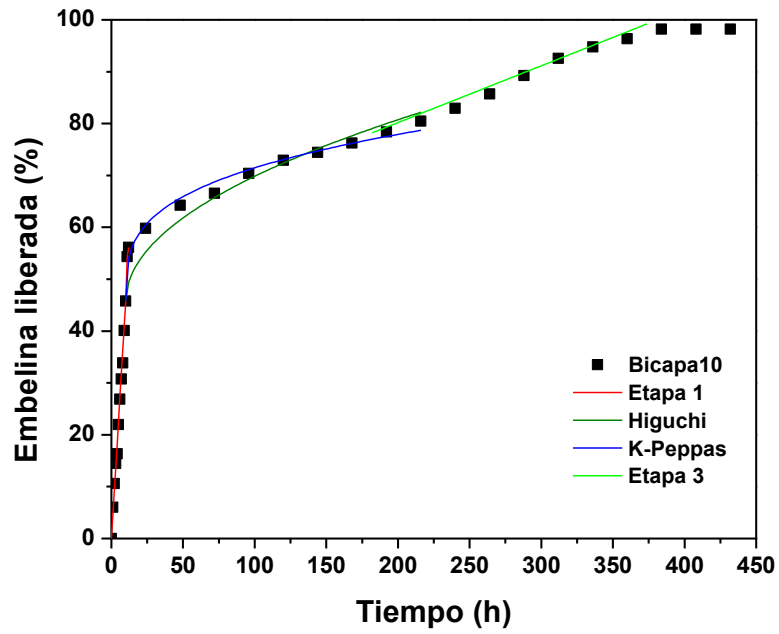


Fig. 4.25. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz bicapa10 en PBS (pH = 7,4)

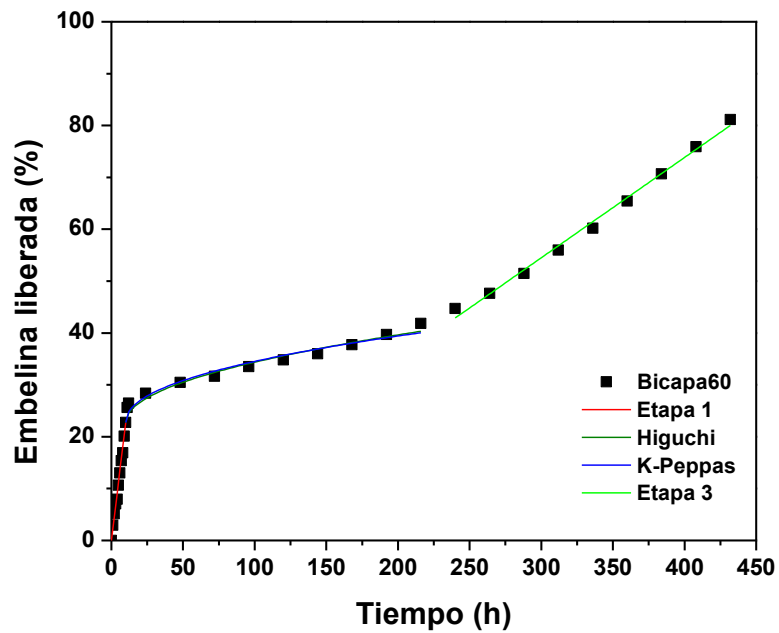


Fig. 4.26. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz bicapa60 en PBS (pH = 7,4)

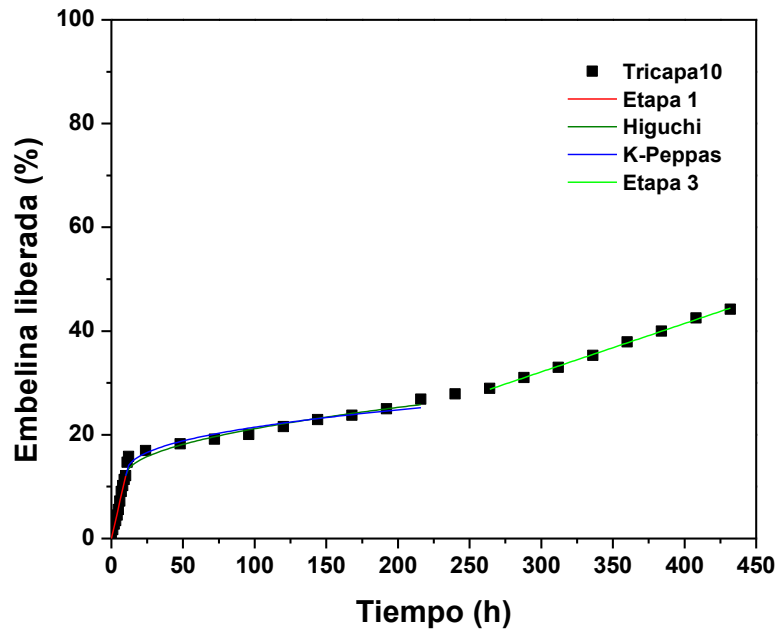


Fig. 4.27. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz tricapa10 en PBS (pH = 7,4)

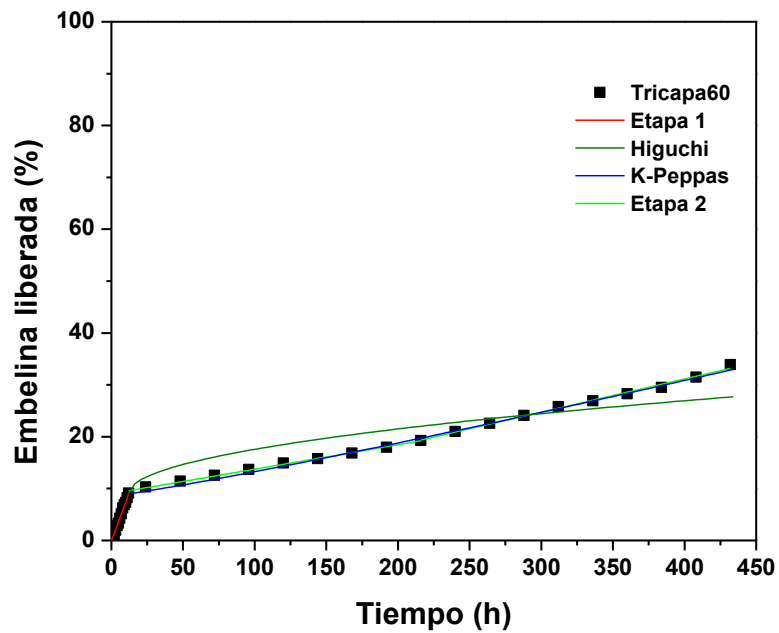


Fig. 4.28. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz tricapa60 en PBS (pH = 7,4)

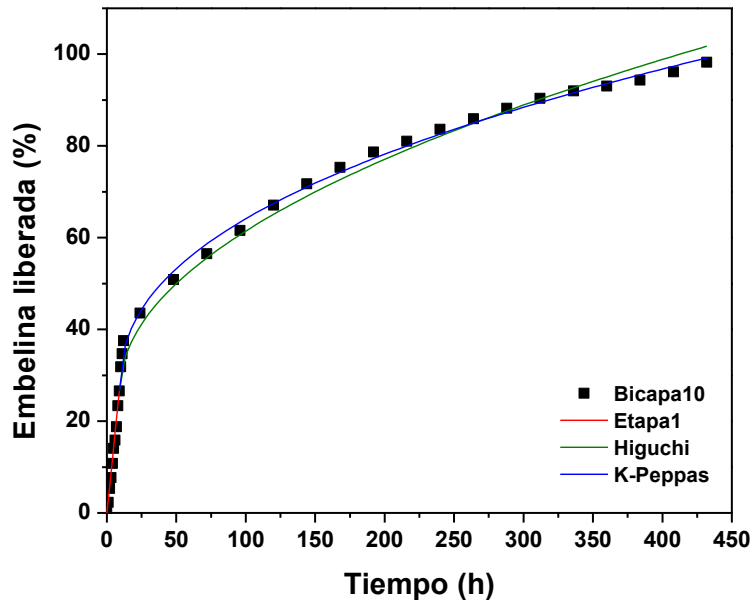


Fig. 4.29. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz bicapa10 en PCB (pH = 5)

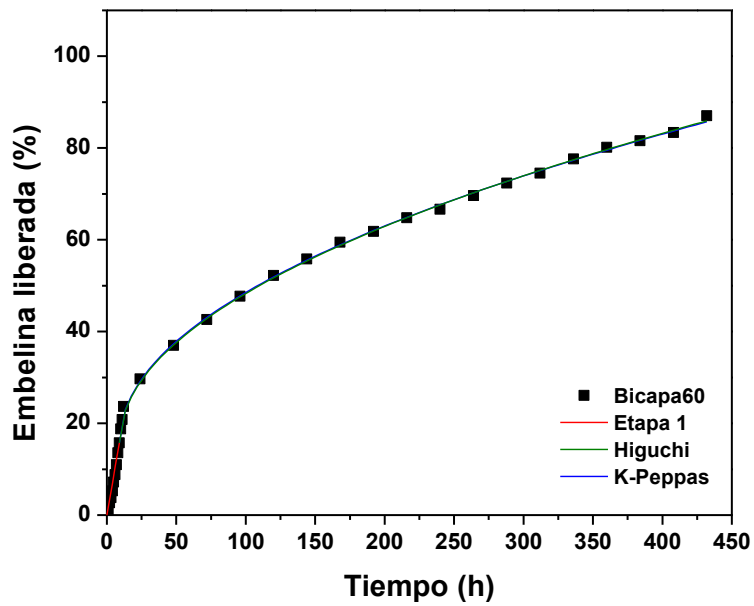


Fig. 4.30. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz bicapa60 en PCB (pH = 5)

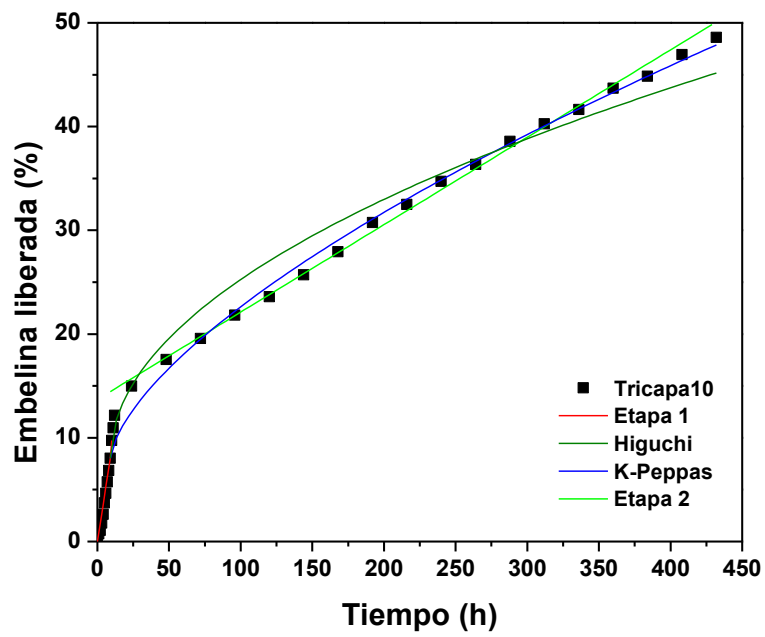


Fig. 4.31. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz tricapa10 en PCB (pH = 5)

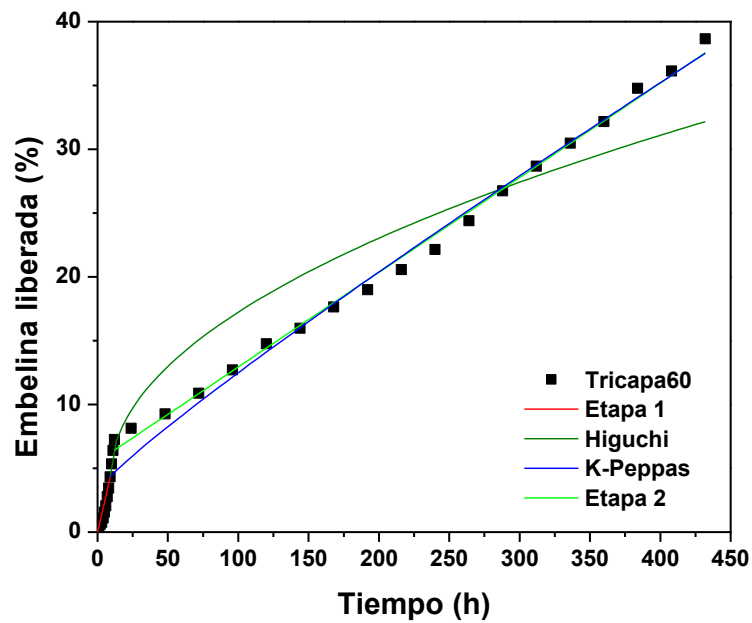


Fig. 4.32. Ajuste de la curva de liberación de embelina de matriz tricapa60 en PCB (pH = 5).

4.5. Conclusiones parciales

Se obtuvieron membranas poliméricas micro/nanofibrasas con embelina incorporada a partir de distintas mezclas de solventes, concentraciones de embelina y estructuras multicapa. Los procesos de liberación de embelina se llevaron a cabo en medios con diferente pH, siempre en condiciones alejadas de la saturación o de perfecta solubilidad del agente activo.

El empleo de la mezcla de solventes DCM:DMF permitió una mejor eficiencia de encapsulación de embelina en las matrices micro/nanofibrasas, obteniendo valores acordes a los encontrados en la literatura para otros agentes terapéuticos en PCL. Además este solvente condujo a la obtención de perfiles de liberación con menor liberación inicial.

La capacidad de carga de las matrices de PCLE disminuyó cuando se emplearon cantidades de embelina menores en la solución, así como también con el incremento del número de capas.

La disminución de la concentración de embelina condujo a una menor liberación inicial de orden cero y a un aumento del tiempo de liberación. Los resultados indican que la liberación inicial de embelina es fuertemente dependiente del pH del medio y la solubilidad del principio activo en esas condiciones. El perfil de liberación de los sistemas dependió del contenido de embelina presente en las matrices nanofibrasas, encontrándose en todos los casos dentro de la ventana terapéutica de la embelina.

Se propusieron algunas estrategias para modular los perfiles de liberación *in vitro* de embelina y al mismo tiempo disminuir el efecto de liberación inicial rápida en matrices de PCLE. Dado que la matriz de PCLE3 presentó la mayor eficiencia de encapsulación y capacidad de carga, se seleccionó esta matriz como base para la preparación de matrices bicapa y tricapa. La matriz nanofibrosa de PCL como recubrimiento de PCLE3 no constituyó una barrera impermeable al proceso de liberación. Los resultados evidenciaron que es posible modular el perfil de liberación del sistema dependiendo del número y espesor de capas introducidas en la matriz base que actúa como reservorio de embelina.

Por lo anteriormente expuesto, puede concluirse que estos sistemas nanofibrosos poseen una importante potencialidad como sistemas de liberación controlada de embelina.

4.6. Referencias

- [1] A.K. Bajpai, S.K. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, "Responsive polymers in controlled drug delivery". *Progr. Polym. Sci.*, 33, 1088 – 1118, 2008.
- [2] M. Chasin, R. Langer, *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, New York - Basel - Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1990.
- [3] F. Theeuwes, "Elementary osmotic pump". *J. Pharm. Sci.*, 12(64), 1987 - 1991, 1975.
- [4] R.A. Fassihi, W.A. Ritschel, "Multiple-layer, direct-compression, controlled-release system: in vitro and in vivo evaluation". *J Pharm Sci.*, 82(7), 750 - 754, 1993 .
- [5] N. Peppas, "Devices based on intelligent biopolymers for oral protein delivery". *Int. J. Pharm.*, 227, 11 - 17, 2004.
- [6] G. Levy, J.R. Leonards, J.A. Procknal, "Development of in vitro dissolution tests which correlate quantitatively with dissolution rate-limited drug absorption in man". *J Pharm Sci.*, 54, 1719 – 1722, 1965.
- [7] G. Levy, "Effect of certain tablet formulation factors on dissolution rate of the active ingredient. I. mportance of using appropriate agitation intensities for in vitro dissolution rate measurements to reflect in vivo conditions". *J Pharm Sci.*, 52, 1039 – 1046, 1963.
- [8] D.E. Wurster, G.P. Polli, "Investigation of drug release from solids IV. Influence of adsorption on the dissolution rate". *J. Pharm. Sci.*, 5(50), 403 - 406, 1961.
- [9] M. GIBALDI, S. FELDMAN, "Establishment of Sink Conditions in Dissolution Rate Determinations". *J. Pharm. Sci.*, 10(56), 1238 - 1242, 1967.
- [10] X. Huang, C.S. Brazel, "On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems". *J. Control. Release*, 73, 121 – 136, 2001.
- [11] J.A. Setterstrom, T.R. Tice, W.E. Meyers, J.W. Vincent, "Development of encapsulated antibiotics for topical administration to wounds", de *Second World Congress on Biomaterials 10th Annual Meeting of the Society for Biomaterials*, Washington, DC, 1984.
- [12] J. Siepmann, N.A. Peppas, "Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 48, 139 - 157, 2001.
- [13] P. Colombo, U. Conte, A. Gazzaniga, L. Maggi, M.E. Sangalli, N.A. Peppas, A. La Manna, "Drug release modulation by physical restrictions of matrix swelling". *Int. J. Pharm.*, 63, 43 - 48, 1990.

- [14] K. Tahara, K. Yamamoto, T. Nishihata, "Overall mechanism behind matrix sustained release (SR) tablets prepared with hydroxypropyl methylcellulose 2910". *J. Control. Release*, 35, 59-66, 1995.
- [15] N.V. Mulye, S.J. Turco, "Use of dicalcium phosphate dihydrate for sustained release of highly water soluble drugs". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 20, 2621 - 2632, 1994.
- [16] N.V. Mulye, S.J. Turco, "A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dehydrate matrices". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 21, 943 - 953, 1995.
- [17] T. Higuchi, "Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspensions". *J. Pharm. Sci.*, 50, 874 - 875, 1961.
- [18] R.W. Korsmeyer, N.A. Peppas, "Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs". *J. Membr. Sci.*, 9, 211 - 227, 1981.
- [19] T.G. Gagandeep, B. Malik, G. Rath, A.K. Goyal, "Development and characterization of nano-fiber patch for the treatment of glaucoma". *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2013.
- [20] C.M. Valmikinathan, S. Defroda, X. Yu, "Polycaprolactone and bovine serum albumin based nanofibers for controlled release of nerve growth factor". *Biomacromolecules*, 10, 1084 – 1089, 2009.
- [21] T. Amna, N.A.M. Barakatb, M. Shamshi Hassanb, M-S.Khil, H. Y. Kimb, "Camptothecin loaded poly(ϵ -caprolactone) nanofibers via one-step electrospinning and their cytotoxicity impact". *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 431, 1 – 8, 2013.

Capítulo 5

Obtención y caracterización de micropartículas poliméricas con embelina y su evaluación como sistemas de liberación

5.1. Introducción

5.1.1. Preparación de micro/nanopartículas poliméricas

Las micro/nanopartículas de polímeros biodegradables son motivo de una intensa investigación en particular en el campo biomédico, donde encuentran importantes aplicaciones como sistemas de liberación de agentes terapéuticos. En el ámbito farmacéutico las partículas poliméricas resultan muy atractivas, dado que permiten mejorar la biodisponibilidad, solubilidad y tiempo de retención de agentes terapéuticos solubles o poco solubles en agua [1, 2]. Las formulaciones de partículas poliméricas con agentes terapéuticos, permiten reducir los costos de las terapias y riesgos de toxicidad para el paciente [3]; aumentan la eficacia, especificidad, tolerabilidad y degradación prematura del agente terapéutico [4], y mejoran la interacción con el medio biológico, su absorción en los tejidos y penetración intracelular [5, 6].

Las formulaciones de micro y nanopartículas poliméricas biodegradables permiten administrar de manera controlada y sostenida la liberación de un agente terapéutico. Entre las características más notables se encuentran: alta biocompatibilidad con células y tejidos, estabilidad en circulación sanguínea, no son tóxicas, no son trombogénicas, no presentan respuesta inmune, no inducen efectos inflamatorios, no activan los neutrófilos, evitan el sistema retículoendotelial y permiten la incorporación de diversos agentes tales como fármacos, proteínas, péptidos, y ácidos nucleicos.

Las posibles vías de administración de micro- y nanopartículas poliméricas son muy variadas, e incluyen la administración por vía oral, inyectables por vía parenteral, administración tópica y sistemas de liberación controlada de modo local [7, 8]. Además, la posibilidad de administrar partículas a través de mucosas resulta muy atractiva, incluyendo la mucosa oftálmica y nasal, siendo esta última una vía de aplicación muy prometedora [7, 9]. Existen aplicaciones de micro y nanopartículas poliméricas en enfermedades de alto impacto tales como cáncer [10], SIDA [11, 12], diabetes [13], enfermedades causadas por patógenos como malaria y leishmaniasis, la enfermedad de priones y la

tuberculosis, se encuentran en diferente fase de prueba y algunos de ellos se comercializan [14, 15].

Los sistemas particulados que pueden actuar en liberación controlada de agentes terapéuticos, se pueden clasificar en función de su tamaño y distribución, e interacción de la partícula y el agente. Estas características resultan muy importantes, dado que definen la interacción de las partículas con la membrana celular y su penetración a través de las barreras fisiológicas naturales. En la Fig. 5.1 se observan los diferentes tipos de sistemas particulados y las posibles interacciones con el agente terapéutico.

Existen diferentes técnicas para la obtención de micro y nanopartículas poliméricas, presentando cada una ventajas y desventajas. La elección de la técnica adecuada depende principalmente de la aplicación que se desee, debiendo también considerar las características físico-químicas del material polimérico, el agente terapéutico a vehiculizar o encapsular, y la interacción entre ellos. A continuación se mencionan las técnicas de preparación convencionales de micro y nanopartículas, junto con sus principales ventajas y desventajas.

Emulsión//liofilización (emulsion/freeze drying): en este método están incluidas todas las técnicas en las que tiene lugar un proceso de eliminación de solvente en el que se encuentra disuelto el polímero. En todos los casos se requiere la formación de una emulsión que dependerá de las características del polímero y del agente terapéutico. Las emulsiones obtenidas dependen de la secuencia del solvente agregado, y pueden ser, aceite en agua (o/w), agua en aceite en agua (doble emulsión, w/o/w), aceite en aceite (o/o), agua en aceite en agua (w/o/w/o), agua en aceite en aceite (w/o/o), o agua en aceite en aceite en aceite (w/o/o/o). Aunque el método de eliminación de solvente es conceptualmente simple, existen muchas variables que pueden influir, tales como el solvente empleado, la naturaleza y cantidad del emulsionante, naturaleza y solubilidad del agente terapéutico, temperatura de evaporación del solvente, relación de volumen de las fases orgánica y acuosa, relación de masas de principio activo y polímero, estructura y peso molecular del polímero, y tipo y velocidad de agitación. Finalmente las partículas son recolectadas por centrifugación (o ultracentrifugación), lavadas en agua para eliminar los

surfactantes tales como dodecilsulfato de sodio o poli(vinil alcohol) que se suelen emplear en la emulsión para minimizar la coalescencia de partículas. Esta técnica es más lenta que la nanoprecipitación, que ocurre en milisegundos.

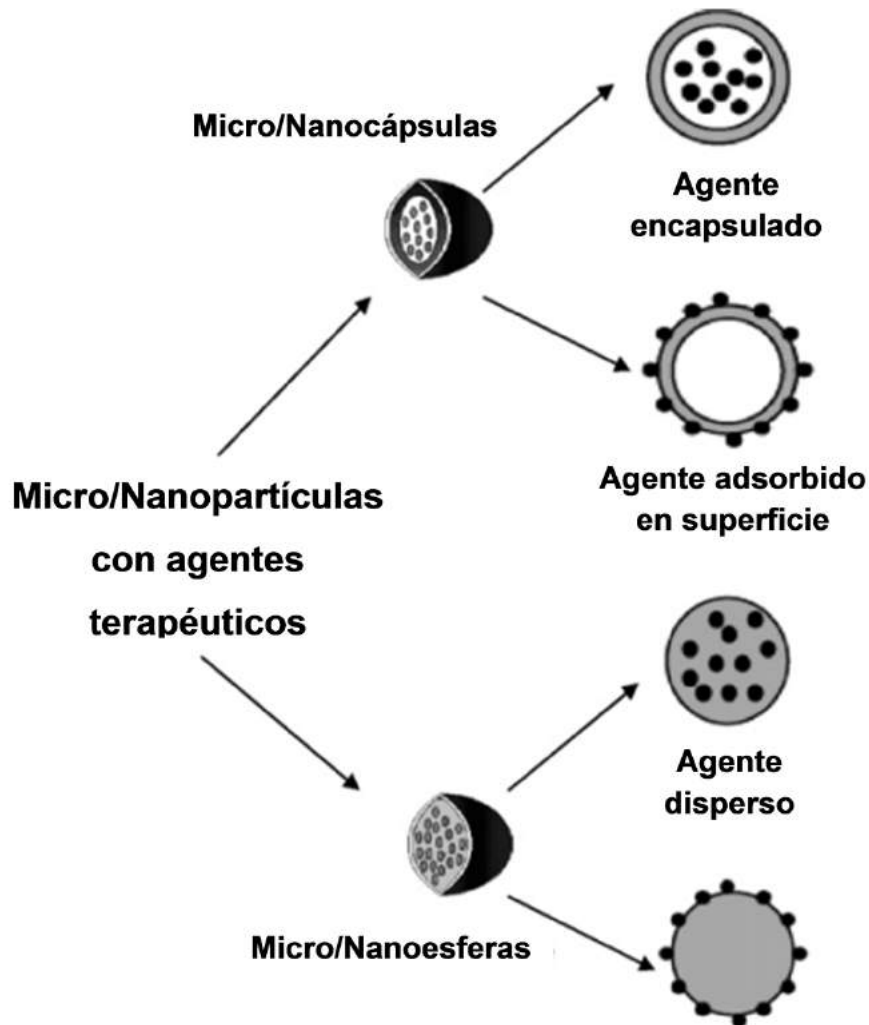


Fig. 5.1. Clasificación de partículas poliméricas y su relación con el agente terapéutico

Existen numerosos trabajos reportados que describen el éxito de esta técnica en la encapsulación y vehiculización de agentes terapéuticos, en particular lipofílicos, en micro- y nanopartículas. Sin embargo, cuando se trata de agentes hidrofílicos tales como proteínas y péptidos, la eficiencia de carga suele ser baja, debido a que éstos pueden difundir a la fase acuosa antes de que el polímero pueda solidificar para atraparlo. En estos casos se emplea la

doble emulsión, reduciendo las pérdidas por solubilidad y preservando la bioactividad de agentes delicados, como son las proteínas en la fase acuosa.

La correcta elección del método a emplear resulta clave y es función de las características y naturaleza de los materiales, como así también el método de secado, que definen la estabilidad de las partículas, la eficiencia de carga de agente terapéutico y eficiencia del proceso [8, 16].

Coacervación (coaservation): es un método de preparación de micro y nanoesferas, se usa principalmente para dispersar agentes terapéuticos solubles en agua. Consiste en disolver el polímero en un solvente orgánico y el agente en agua, luego se obtiene una emulsión por adición de la solución acuosa en la orgánica. Un primer solvente para el polímero se adiciona lentamente al sistema, formándose gotas de coacervados que son blandas. Para ser recolectadas, resulta necesaria la adición de un segundo no solvente para endurecer las gotas y formar las esferas.

La ventaja más importante que presenta este método, es que permite la producción sencilla de micropartículas que pueden contener agentes hidrofóbicos, tales como aceites esenciales. Algunas desventajas de este método son principalmente la aglomeración de las partículas, dado que no se emplea un estabilizador o emulsionante. Además la falta de reproducibilidad en este proceso, no asegura una estabilidad sobre todo en el perfil de liberación. Por último, resulta costoso comparado con otros métodos debido a la gran cantidad de solventes que se requieren y a la mayor contaminación ambiental.

Secado por atomización (Spray-drying): es un método que permite obtener micropartículas mediante secado en una corriente de aire caliente, a partir de la atomización de una solución polimérica o emulsión con un agente terapéutico. Si bien es una técnica que permite un buen escalado a nivel industrial, presenta como desventajas, inconvenientes en el control de la polidispersidad de tamaño de partículas, y posibles alteraciones de la estructura de los materiales poliméricos y agentes terapéuticos por efecto de la elevada temperatura de la corriente de aire para secado [16, 17].

Dispersión mejorada de soluciones mediante fluidos supercríticos (Solution-enhanced dispersion method, SEDS): este método implica el uso de fluidos supercríticos, entendiéndose como tales a las sustancias a una temperatura y presión por encima de su punto crítico (fase única en la que la sustancia demuestra propiedades tanto de gas como de líquido). El fluido que más se utiliza por su costo y disponibilidad entre otras ventajas es el CO₂, debido a que es capaz de disminuir la temperatura de transición vítrea de muchos polímeros [18]. Este método ha sido utilizado para la producción de sistemas particulados poliméricos, micelas y liposomas. Dentro de las ventajas del método se destacan que el dióxido de carbono es de baja toxicidad, no inflamable y es fácil lograr condiciones críticas, por otro lado ni el polímero ni el agente requieren ser solubles en él. Las condiciones de procesamiento (presión y temperatura) son moderadas, no hay utilización de solventes ni necesidad de removerlos. Es un proceso de un solo paso, una tecnología ambientalmente aceptable y evita la oxidación o degradación térmica del agente. No obstante, la información sobre el método en cuanto a su aplicación sobre encapsulación de agentes terapéuticos es escasa y aún tiene limitaciones en cuanto al control del tamaño de la partícula.

Técnica de fundidos (Hot melt technique): mediante esta técnica se obtienen microesferas de polímeros con baja temperatura de fusión. El polímero fundido se dispersa en un medio de dispersión determinado y lentamente se enfría para formar microesferas. Este método resulta particularmente útil en el caso de materiales susceptibles a hidrólisis en presencia de agua.

Nanoprecipitación (nanoprecipitation): también llamado método de desplazamiento de solvente es uno de los métodos más empleados para la preparación de nanopartículas. Esta técnica se utiliza para la encapsulación de agentes terapéuticos hidrofóbicos pero también se ha adaptado para agentes hidrofílicos. El agente y un polímero portador ambos disueltos en un solvente orgánico se gotean de forma constante y bajo agitación sobre una solución acuosa. Las nanopartículas polímero/agente terapéutico se forman instantáneamente cuando el solvente orgánico difunde a la fase acuosa. Finalmente el solvente se elimina a presión reducida. La miscibilidad del

solvente con el agua es el parámetro más crítico que gobierna la eficiencia de este proceso.

Entre las técnicas no convencionales para la obtención de micro/nanopartículas se encuentran microfluídica, técnicas de replicación *top-down*, atomización electrohidrodinámica.

Microfluídica (microfluidics): consiste en la manipulación de fluidos en la escala de nano/picolitros y existen diferentes aproximaciones. La más común consiste en dos corrientes de fluido que contienen una fase continua y una a dispersar, y que se ponen en contacto mediante infusión, de manera tal que la fase dispersa queda confinada en forma de gotas aisladas o una corriente más estrecha

Técnicas de replicación top-down: estas técnicas permiten obtener grandes cantidades de partículas con excelente control del tamaño y la forma. En particular la técnica denominada PRINT® (*particle replication in non-wetting template*) es una técnica “de arriba a abajo” dado que parte de un molde con cavidades predefinidas en tamaño y forma de un material en el cual la solución polimérica no puede ingresar espontáneamente, y en el cual se confina bajo presión, y posteriormente se efectúa entrecruzamiento o evaporación de solvente [19].

Atomización electrohidrodinámica (Electrohydrodynamic Atomization, EHDA): también llamada electrospraying, constituye una técnica de vanguardia para la preparación de micro- y nanopartículas. Los fundamentos se presentaron en detalle en la sección 1.5. La técnica de EHDA presenta numerosas ventajas, el uso de una solución que no necesariamente es una emulsión, el empleo de temperaturas que no degradan las estructuras químicas del polímero y/o agente terapéutico, el secado instantáneo del solvente de las partículas durante proceso, y la capacidad de control sobre la distribución de tamaño de partícula, con la posibilidad de producir partículas cuasi monodispersas.

5.1.2. Micro/nanopartículas poliméricas como sistemas de liberación controlada

La encapsulación y liberación de agentes terapéuticos a partir de partículas poliméricas representa un gran avance de las terapias de administración de diversos fármacos, proteínas y factores de crecimiento, dado que la liberación sostenida y controlada es fundamental en la obtención de un efecto terapéutico positivo. Con este objetivo, la técnica de EHDA está avanzando rápidamente como una tecnología prometedora para la producción de partículas poliméricas que contienen agentes terapéuticos. En comparación con las técnicas de fabricación de emulsión tradicionales, la EHDA tiene el potencial de reducir la desnaturalización de los agentes terapéuticos, proporcionando un control más estricto sobre la distribución de tamaño de las partículas y su morfología [20].

En algunos agentes tales como las proteínas, la desnaturalización es un problema frecuente cuando se utilizan solventes orgánicos en la obtención de sistemas particulados. La técnica de EHDA ofrece un contacto reducido de los agentes terapéuticos con el disolvente y además no requieren necesariamente el empleo de una emulsión, como sucede en los procesos de producción de partículas tradicionales [21]. En ese sentido resulta una técnica superior a las técnicas tradicionales para la carga de agentes terapéuticos de pequeño tamaño sensibles a la desnaturalización. Por otro lado, los agentes terapéuticos presentan características fisicoquímicas y estructurales muy diferentes entre sí, tales como solubilidad, hidrofobicidad e hidrofiliidad, que requieren el ajuste de los parámetros experimentales o configuración de los procesos tradicionales para la preparación de los sistemas particulados. La técnica de EHDA, resulta adecuada para incorporar moléculas difíciles de procesar en micro y nanopartículas, requiriendo mínimas modificaciones de los parámetros del proceso [22].

Existen varios ejemplos en la literatura que describen y analizan el desarrollo de partículas mediante EHDA incorporando agentes terapéuticos para aplicaciones en el campo de las terapias inhalatorias [22, 23], liberación de antibióticos [24, 25], tratamientos para cáncer [26, 27, 28] y tratamientos hormonales [29, 30], entre otros. Estas partículas pueden emplearse a través de la mayoría de las rutas de administración de drogas: oral, inyección, inhalación

y oftalmológica, y tienen una gran capacidad para facilitar la vectorización activa y pasiva.

Como se mencionó en la sección 5.1.2, mediante EHDA es posible obtener micro/nanoesferas poliméricas, en las que el agente terapéutico se distribuye homogénea e íntimamente dentro de la masa y estructura del polímero, y también micro/nanocápsulas, en las que el agente terapéutico se encuentra formando un núcleo (*core*) rodeado por una cubierta de polímero (*shell*). En la Fig. 5.2 se esquematizan los procesos para la obtención de los diferentes tipos de partículas.

Las micro/nanoesferas con agentes terapéuticos se pueden obtener mediante EHDA monoaxial, donde el agente se mezcla con la solución polimérica antes de comenzar el proceso de atomización. En este caso el agente terapéutico puede ser incorporado a la solución polimérica directamente en estado sólido, mezclando mediante agitación. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza del agente terapéutico, éste puede disolverse previamente en una solución acuosa y posteriormente ser incorporado a la solución polimérica por emulsión o nanoprecipitación. Las emulsiones más utilizadas son la emulsión simple de aceite en agua (o/w) y la doble emulsión de agua en aceite agua (w/o/o), dado que proporcionan acceso a una amplia gama de tamaños de partículas mediante el ajuste de las variables del proceso. Al igual que en las técnicas clásicas, es posible emplear diferentes agentes surfactantes, a fin de mejorar la eficiencia de encapsulación y controlar los perfiles de liberación [31]. Sin embargo, la existencia de la interfaz entre fase acuosa y oleosa, puede producir la desnaturalización parcial del agente terapéutico y agregación de las partículas, principales inconvenientes mencionados de los métodos basados en emulsión. El empleo de la nanoprecipitación, evita los inconvenientes asociados a la desnaturalización del agente terapéutico, aunque no permite solucionar completamente los problemas asociados a la agregación de las partículas [32]. La dispersión sólida resulta la opción más atractiva en EHDA monoaxial, dado que evita la desnaturalización del agente incorporado, proporcionando alta versatilidad de los agentes terapéuticos que pueden ser encapsulados.

Las micro/nanocápsulas pueden obtenerse mediante el empleo de EHDA coaxial, en donde la solución del agente terapéutico (núcleo) y la solución del

polímero (cáscara externa) se infunden a través de un sistema de agujas concéntricas. En este caso, el sistema de agujas concéntricas se conecta a jeringas reservorios con flujos independientes, controlados mediante dos bombas de infusión. Algunas ventajas del EHDA coaxial incluyen, mayor eficiencia de encapsulación de los agentes terapéuticos y menor riesgo de desnaturalización del agente. Dado que los agentes terapéuticos permanecen en solución acuosa dentro de las micro/nanocápsulas, puede ocurrir que pierdan parte o completamente su bioactividad antes de su liberación, esto ocurre debido a que la estabilidad de algunos agentes es mayor en medio seco respecto de medio acuoso. A pesar de ello, la técnica de EHDA coaxial permite un mejor control de la cinética de liberación [33, 34, 35].

Existen sistemas más complejos, tales como EHDA multiaxial con tres agujas concéntricas, que permiten la incorporación de mayor número de agentes terapéuticos en diferentes capas de las micro y nanocápsulas, para liberación secuencial y múltiple [36, 37]. Es posible conseguir esto mismo, mediante EHDA coaxial con dos agujas concéntricas incorporando un agente en el núcleo de solución acuosa y un segundo agente en la cubierta de polímero. Sin embargo, se ha demostrado que la naturaleza hidrofílica del agente terapéutico resulta muy importante y es posible conseguir cápsulas que contienen un fármaco hidrofóbico en el núcleo y un fármaco hidrofílico en la cubierta superficial, mientras que la configuración opuesta es más difícil de lograr [38].

Capítulo 5: Micropartículas poliméricas con embelina como sistemas de liberación

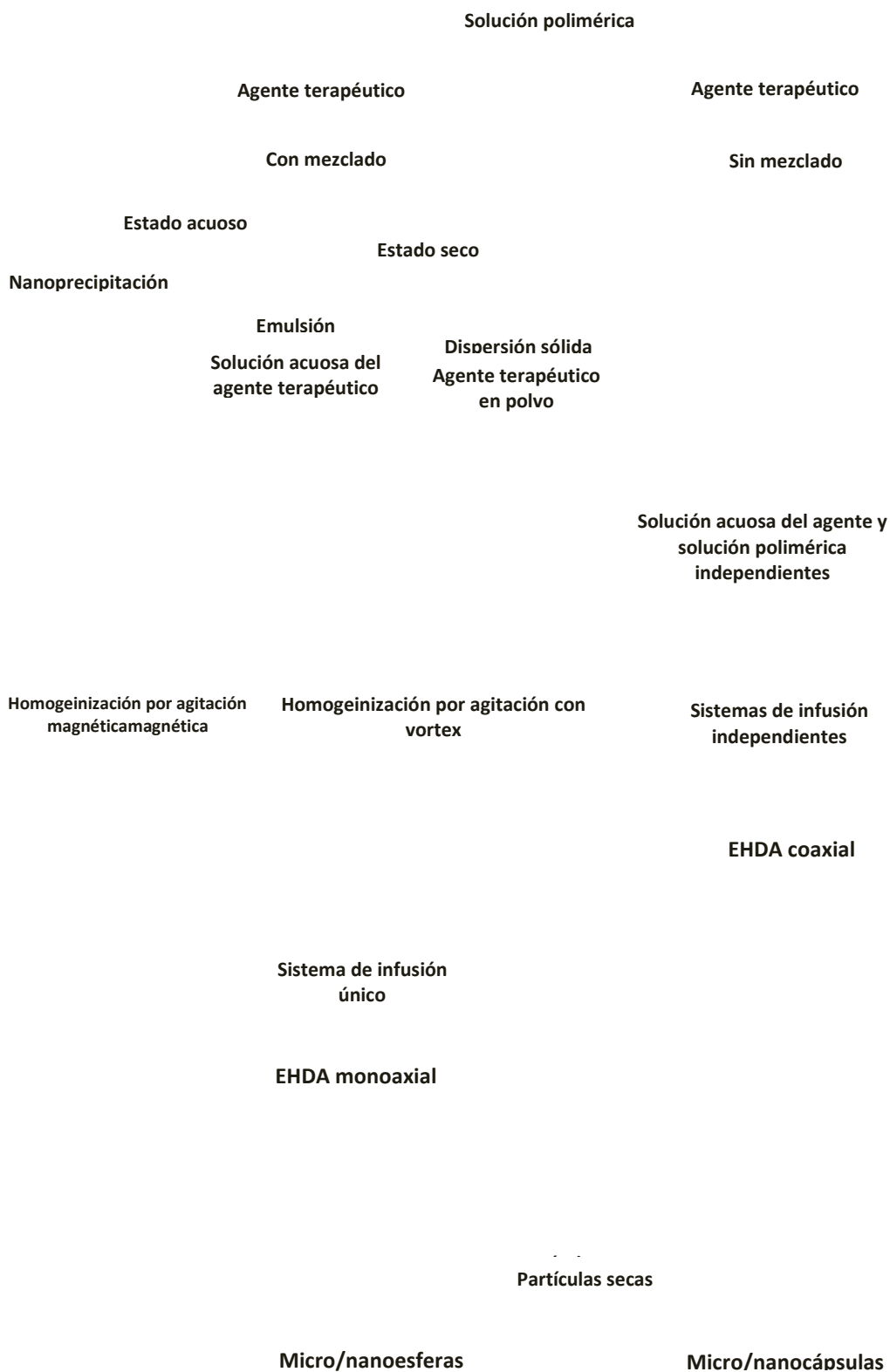


Fig. 5.2. Diferentes métodos de incorporación de agentes bioactivos en partículas poliméricas preparadas mediante EHDA monoaxial (nanoprecipitación, emulsión y dispersión sólida), y EHDA coaxial.

5.1.3. Empleo de la técnica de atomización electrohidrodinámica para la obtención de matrices para ingeniería de tejidos

La proliferación y diferenciación celular es un tema fundamental a considerar en las estrategias asociadas a ingeniería de tejidos y regeneración tisular, en las que generalmente resulta insuficiente el número de células cultivadas, aisladas a partir del propio paciente. Una metodología comúnmente empleada consiste en la proliferación celular a partir de una monocapa de células cultivadas in vitro en una placa de cultivo. Sin embargo, estos sustratos no constituyen una solución óptima al problema, debido a que se requiere de una elevada área superficial para el crecimiento y proliferación de las células. Existen matrices especiales de tamaños micrométricos (*microcarriers*) que permiten obtener cultivos con el número de células suficientes y del fenotipo apropiado para la reparación o regeneración de tejidos dañados, permitiendo además la incorporación de factores de crecimiento específicos de la matriz extracelular para promover la proliferación y diferenciación celular, con mayor eficiencia y un mejor control [39].

Durante las últimas décadas, se han empleado varias técnicas (sección 5.1.1) para la preparación de partículas para aplicaciones en ingeniería de tejidos y regeneración tisular. La EHDA permite en un solo paso, la preparación de micro/nanopartículas de morfología controlada, distribución de tamaños estrecha, y con tamaños que van desde el orden de algunos nanómetros a cientos de micrones. Además, permite la incorporación de factores de crecimiento en una o varias capas a partir del uso de EHDA coaxial, modulando su liberación en la medida que se requiera. Algunos trabajos exploran la posibilidad de encapsular células en partículas de tamaños micrométricos y milimétricos, a partir de polímeros naturales procesados mediante EHDA [40].

La incorporación de partículas en matrices convencionales podría tener diferentes objetivos en las estrategias seguidas por la ingeniería de tejidos, tales como la incorporación de factores de crecimiento o agentes de diferenciación celular, variación de las propiedades mecánicas, degradación, migración celular, o regulación de la porosidad del sistema; incluso podrían emplearse micro y nanopartículas en la obtención de matrices para cultivo celular, a partir de la aglomeración de partículas. Existen ejemplos de

aplicaciones de partículas con el propósito de aumentar la porosidad e interconectividad de poros en estructuras compactas, tal es el caso de micropartículas degradables de pectina en matrices de fosfato de calcio, partículas porosas de PLGA en cementos y micropartículas de poli(trimetilen carbonato) en cementos cerámicos. Es posible encontrar reportes de la incorporación de partículas poliméricas en hidrogeles a fin de mejorar sus propiedades mecánicas, principalmente la rigidez de sus estructuras. En algunos casos las micropartículas empleadas son de un material similar a la matriz, mientras que en otros casos se prefieren partículas de materiales muy diferentes al de la matriz donde se incorporan. Algunos ejemplos consisten en formulaciones inyectables compuestas por micropartículas de PLGA en hidrogeles de quitosano y micropartículas de seda incorporadas en una esponja de seda. En ambos casos la incorporación de las micropartículas permitió aumentar la rigidez de las matrices de base, además de afectar la diferenciación luego de la incorporación de diferentes líneas celulares.

En este capítulo se describe la preparación de micropartículas de PCL con embelina mediante las técnicas de emulsión/liofilización y atomización electrohidrodinámica, así como su caracterización fisicoquímica, térmica y morfológica. Se estudia la cinética de liberación de las micropartículas en dos medios de pH diferente, efectuando el ajuste de las curvas de liberación con los modelos de orden cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas, a partir de los cuales se determinan y analizan los parámetros de ajuste y su relación con los mecanismos de difusión y transporte que tienen lugar durante el proceso.

5.2. Materiales

Poli(ϵ -caprolactona) de peso molecular promedio en peso $42,5 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ y embelina (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona) obtenida como se mencionó en la sección 1.3. Los solventes empleados fueron diclorometano (DCM) y cloroformo (CLF), obtenidos de Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA), los que se emplearon tal como se recibieron, sin purificación adicional.

En la preparación de partículas mediante emulsión/liofilización, se emplearon como surfactante en la fase acuosa poli(vinil alcohol) (PVA) de peso

molecular promedio en peso 31 – 50 kg.mol⁻¹ (Aldrich Chemical Co) y Tween[®] 80 (Aldrich Chemical Co).

5.3. Métodos

5.3.1. Preparación de micropartículas mediante emulsión/liofilización

Las micropartículas de PCL (PCL_{em}) y micropartículas de PCL con embelina (PCLE_{em}) se prepararon empleando la técnica de emulsión-evaporación seguida de liofilización, a partir de una emulsión de fase orgánica en solución acuosa (emulsión *oil in water*, o/w). El método fue patentado por Vanderhoff *et al.* en 1979 [41], y consiste en la preparación de una fase acuosa con un agente estabilizante o surfactante diluido al que posteriormente se le agrega una solución de polímero en un solvente orgánico apropiado, bajo agitación con velocidad controlada (Fig. 5.3, Paso 1). Luego de este proceso, se evapora el solvente de la suspensión (Fig. 5.3, Paso 2) y finalmente, las micropartículas poliméricas formadas se lavan para remover los restos de estabilizante.

Fig. 5.3. Esquema de obtención de partículas mediante el método emulsión/liofilización

Para determinar la composición y condiciones de procesamiento óptimas para la obtención de micropartículas se realizaron numerosos ensayos variando la velocidad de infusión de la solución orgánica en el medio acuoso, la velocidad de homogeneización, y el tipo y concentración del surfactante utilizado en la solución acuosa, visualizando las partículas obtenidas mediante imágenes SEM.

Se empleó una fase orgánica de solución de PCL en DCM en concentración 0,4 % p/v. La embelina se agregó a la solución orgánica en relación E/PCL 10% p/p. La emulsión o/w se obtuvo agregando la fase orgánica a una solución acuosa de PVA (1 y 2 % p/v) o Tween 80 (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 % p/v) mediante una bomba de infusión (Activa A22 ADOX S.A., Ituzaingó, Argentina) con una determinada velocidad de infusión ($\Phi = 5, 10, 15, 30 \text{ ml.h}^{-1}$) y agitando con un homogeneizador de alta velocidad (IKA Works GmbH & Co., Alemania, modelo Ultra-turrax® T-18) a distintas velocidades ($v = 11200, 15600, 20000, 24000 \text{ rpm}$) durante 1,5 h. La emulsión obtenida se agitó vigorosamente durante 24 h a temperatura ambiente, para facilitar la evaporación del solvente. La suspensión de partículas resultante se lavó mediante 3 ciclos de 15 min de centrifugación a 14500 rpm empleando una ultracentrífuga (Sigma GmbH 4-15, Osterode am Harz, Alemania) con renovación parcial de medio acuoso, y finalmente se liofilizó (liofilizador Virtis SP Industries, Benchtop 2.0K) durante 48 h.

5.3.2. Preparación de micropartículas mediante atomización electrohidrodinámica (EHDA)

Las micropartículas de PCL (PCL_{sp}) y micropartículas de PCL con embelina (PCLE_{sp}) se prepararon empleando la técnica de atomización electrohidrodinámica (EHDA) [7]. Se prepararon soluciones de PCL en CLF al 7 % p/v, incorporando embelina en relación 10 % p/p respecto a PCL.

Las soluciones se cargaron en una jeringa de polipropileno de 10 ml, conectada a través de un tubo de poliamida a una aguja de acero inoxidable de punta roma (gauge 18), utilizada como boquilla. La velocidad de flujo se controló mediante una bomba de infusión (Activa A22 ADOX S.A., Ituzaingó, Argentina). Se utilizó una fuente de alta tensión (ES30P, Gamma High Voltage Research Inc., Ormond Beach, FL, USA.), conectando el electrodo de polaridad positiva a la boquilla y el electrodo de puesta a tierra a una placa colectora de aluminio. Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y humedad relativa inferior a 50 %, en una cámara acrílica con sistema de ventilación.

Para determinar las condiciones óptimas de procesamiento para la obtención de micropartículas se realizaron numerosos ensayos variando la

distancia boquilla – colector entre 15 y 25 cm y el potencial aplicado entre 10 y 20 kV.

Finalmente, las soluciones poliméricas se electropulverizaron empleando un potencial positivo de 17 kV, con distancia boquilla – colector de 15 cm, y una velocidad de infusión de 0,6 ml.h⁻¹. Las partículas se depositaron sobre colector plano en papel de aluminio, con recambio del papel de aluminio cada 1 h, a fin de minimizar la aglomeración de las partículas.

5.4. Caracterización de micropartículas

5.4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las micropartículas de PCL y PCLE se analizó mediante SEM, utilizando el microscopio y la técnica de preparación de muestras descriptos en la sección 2.4.1.

El análisis de las imágenes de SEM resultó muy importante para la selección de las condiciones óptimas para la obtención de micropartículas mediante emulsión/liofilización, como se muestra en las Fig. 5.4, 5.5 y 5.6.

5.4.2. Determinación del tamaño de partículas y potencial Z

La determinación del tamaño y potencial Z de las micropartículas de PCL y PCLE preparadas mediante emulsión/liofilización y EHDA se realizó empleando la técnica de dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS). Se utilizó un equipo Zetasizer (Nano-ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Las mediciones se realizaron en tres muestras diferentes obtenidas bajo las mismas condiciones. Se efectuaron 6 mediciones con 18 iteraciones cada muestra. Las micropartículas se redispersaron en agua destilada empleando vortex durante 5 min antes de cada medición. Los resultados de diámetro medio de partícula se expresaron como $D_m \pm d.e.$ Los valores de potencial Z se determinaron usando el mismo equipo.

5.4.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

0

Las propiedades térmicas de PCL, embelina, y las micropartículas con y sin embelina, se evaluaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), empleando el calorímetro descrito en la sección 3.4.2.

5.4.4. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

A fin de evaluar las características y composición de superficie de las micropartículas, se realizó el análisis mediante espectroscopía infrarroja FTIR-ATR, de acuerdo a las características mencionadas en la sección 3.4.3.

5.4.5. Difracción de Rayos X (DRX)

El análisis mediante difracción de rayos X (DRX) de embelina, PCL y de las micropartículas con y sin embelina, se realizó empleando el difractómetro y características de barrido descritos en la sección 3.4.4.

5.4.6. Cuantificación de la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación de embelina

El contenido de embelina de las micropartículas se determinó mediante espectroscopía ultravioleta-visible empleando el espectrómetro descrito en la sección 4.3.3. Se disolvieron muestras de 2 mg de micropartículas en mezcla de solventes DCM:DMF (1:1), y posteriormente se determinaron los valores de absorbancia considerando la intensidad de la banda de absorción $\lambda = 296$ nm. Finalmente, se determinó su concentración a partir de las curva de calibración correspondiente de embelina DCM:DMF. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como valor medio \pm desviación estándar (d.e.). Las diferencias estadísticas entre los valores medidos, se determinaron mediante la aplicación de test de *Student* con un intervalo de confianza de 95 %.

La capacidad de carga (CC) y eficiencia de encapsulación (EE) se calcularon mediante las ecuaciones 4.6 y 4.7. En la literatura también se

encuentra reportada otra forma de expresión de la eficiencia de encapsulación (EF):

$$\text{---} \quad (5.1)$$

donde m_{em} corresponde a la masa de embelina presente en las micropartículas y m_{em0} a la masa de embelina inicial en la solución polimérica

5.4.7. Determinación de la liberación de embelina

Los ensayos de liberación de embelina a partir de las micropartículas PCLE_{em} y PLCE_{sp} se efectuaron en solución reguladora (*buffer*) fosfato (PBS, pH = 7,4) y citrato (PCB, pH = 5,0). Los ensayos se realizaron por triplicado en frascos de vidrio conteniendo 100 ml de solución reguladora a 37 °C. Las micropartículas se colocaron en bolsas de diálisis (peso molecular de corte 14.000 kg.mol⁻¹, Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA) selladas perfectamente en ambos extremos, introduciendo en el interior 20 ml adicionales de la solución reguladora correspondiente, la cual se agitó con un agitador orbital a 150 rpm. El número de extracciones no superó el 15 % del volumen total, y se efectuaron 18 extracciones de 1 ml, con reposición de 1 ml de medio fresco cada una hora durante las primeras 12 h y posteriormente una muestra de 1 ml por día durante 6 días.

La concentración de embelina liberada se determinó mediante espectroscopia ultravioleta-visible, evaluando la intensidad de la banda de absorción a $\lambda = 330$ nm para PBS y $\lambda = 349$ nm para PCB. El porcentaje de embelina liberada se calculó dividiendo la cantidad de embelina liberada acumulada en cada tiempo de muestreo por la cantidad inicial de embelina.

5.5. Caracterización fisicoquímica y morfológica de micropartículas

5.5.1. Caracterización morfológica de micropartículas

En las Fig. 5.4, 5.5 y 5.6 se muestran las micrografías SEM de las partículas preparadas mediante emulsión/liofilización, obtenidas durante la puesta a punto y ajuste de las variables del proceso. La Fig. 5.4. muestra las micrografías SEM de las muestras obtenidas con distinta velocidad de infusión y velocidad de homogeneización. La cantidad y calidad de las micropartículas formadas aumentó con la disminución de la velocidad de infusión de la solución orgánica, para una misma velocidad de homogeneización. Los mejores resultados se obtuvieron con una velocidad de infusión $\Phi = 10 \text{ ml.h}^{-1}$ y una velocidad de homogeneización $v = 15600 \text{ rpm}$.

El empleo de menores velocidades de infusión de la solución polimérica en la fase acuosa permitió la formación de mayor cantidad de partículas de morfología esférica más definida.

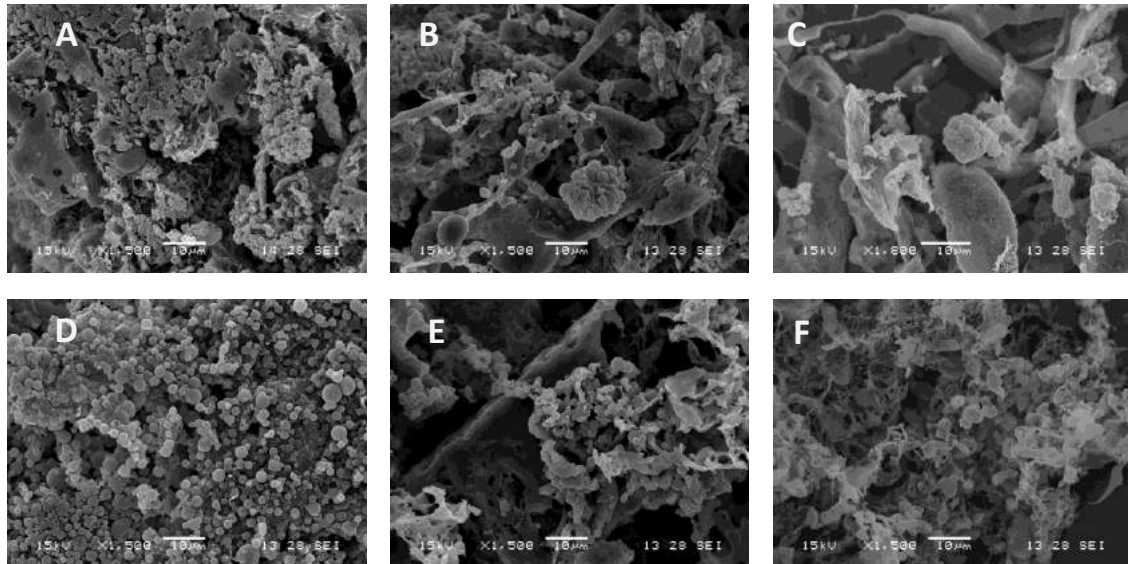


Fig. 5.4. Micrografías SEM (1500X) de micropartículas de PCL obtenidas con $v = 11200 \text{ rpm}$: A) $\Phi = 10 \text{ ml.h}^{-1}$, B) $\Phi = 15 \text{ ml.h}^{-1}$, C) $\Phi = 20 \text{ ml.h}^{-1}$; micropartículas obtenidas con $v = 15600 \text{ rpm}$: D) $\Phi = 10 \text{ ml.h}^{-1}$, E) $\Phi = 15 \text{ ml.h}^{-1}$, F) $\Phi = 20 \text{ ml.h}^{-1}$.

En base a los resultados anteriores, se estudió el efecto de disminuir la velocidad de infusión ($\Phi = 5, 10 \text{ ml.h}^{-1}$) e incrementar la velocidad de

homogenización ($v = 20000, 24000$ rpm). Como se puede observar en las micrografías de la Fig. 5.5, las condiciones utilizadas en 5.5.C y 5.5.D permitieron la obtención de micropartículas homogéneas y desagregadas. En base a estas condiciones experimentales, se prepararon micropartículas incorporando embelina. Las micrografías 5.5.E y 5.5.F muestran las micropartículas de PCL con embelina dispersa. Las micropartículas que mostraron mayor estabilidad, menor grado de agregación y distribución de tamaño más homogénea se obtuvieron con $v = 24000$ rpm y $\Phi = 10$ ml.h⁻¹ (5.5.F).

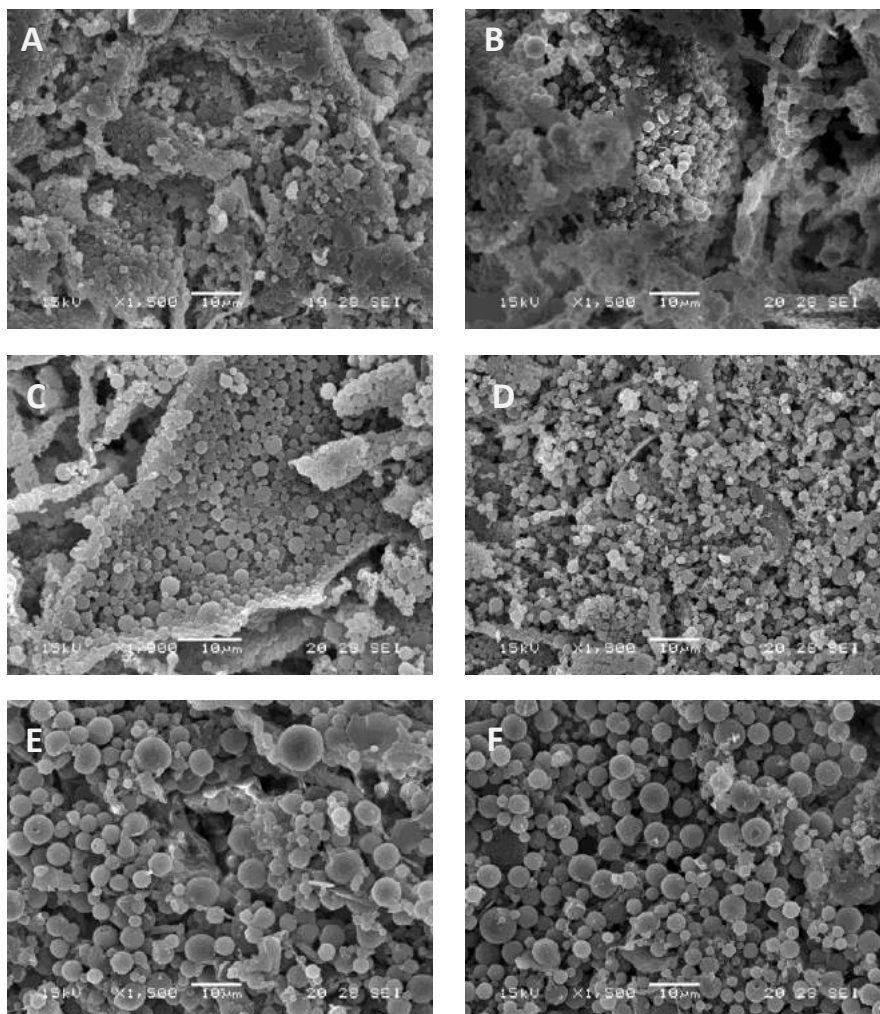


Fig. 5.5. Micrografías SEM (1500X) de micropartículas de PCL obtenidas con velocidad de homogenización $v = 20000$ rpm: A) $\Phi = 5$ ml.h⁻¹, B) $\Phi = 10$ ml.h⁻¹; micropartículas obtenidas con $v = 24000$ rpm: C) $\Phi = 5$ ml.h⁻¹, D) $\Phi = 10$ ml.h⁻¹; partículas con incorporación de embelina y $v = 24000$ rpm: E) $\Phi = 5$ ml.h⁻¹, F) $\Phi = 10$ ml.h⁻¹.

La composición de la superficie de las partículas poliméricas resulta un factor determinante para su estabilidad. En el proceso de obtención de partículas mediante emulsión, la composición de superficie está dada principalmente por tipo y concentración del surfactante utilizado en la fase acuosa. Con el objetivo de conseguir micropartículas con la mayor estabilidad y el menor grado de agregación, se realizaron ensayos modificando la naturaleza y concentración de surfactante de la solución acuosa. Se empleó PVA con mayor concentración (2 % p/v), y por otro lado, se empleó Tween 80 en concentraciones entre 0,1 y 0,4 % p/v. En la Fig. 5.6 se observa que el empleo de una concentración mayor de PVA condujo a la formación de micropartículas con mayor grado de agregación (5.6.A). El mismo efecto se observó con el empleo de Tween 80 al 0,2 % (5.6.B), siendo mayor el grado de agregación con el incremento de la concentración de Tween. Las micrografías 5.6.C y 5.6.D permiten observar la topografía de superficie de las micropartículas obtenidas con menor concentración del surfactante, PVA (1% p/v) y Tween 80 (0,1% p/v). El uso de PVA condujo a la formación de micropartículas esféricas y de alta estabilidad (5.6.C), mientras que el uso de Tween 80 produjo micropartículas con topografía irregular y con restos del surfactante que podrían afectar la estabilidad de las mismas (5.6.D).

Finalmente, se determinó la composición y condiciones de procesamiento óptimas para la obtención de micropartículas. La fase orgánica empleada consiste en una solución de PCL en DCM en relación 0,4 % p/v. La embelina se agregó a la solución orgánica en 10% p/p con relación a PCL. La emulsión o/w se obtuvo, agregando la fase orgánica a una solución acuosa de PVA (1 % p/v) con una velocidad de flujo de $10 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ y homogeneizando a 24000 rpm durante 1,5 h. La emulsión obtenida se agitó vigorosamente durante 24 h a temperatura ambiente, para facilitar la evaporación del solvente. La suspensión de partículas resultante se lavó mediante 3 ciclos de 15 min de centrifugación a 14500 rpm con renovación parcial de medio acuoso, y finalmente se liofilizó durante 48 h.

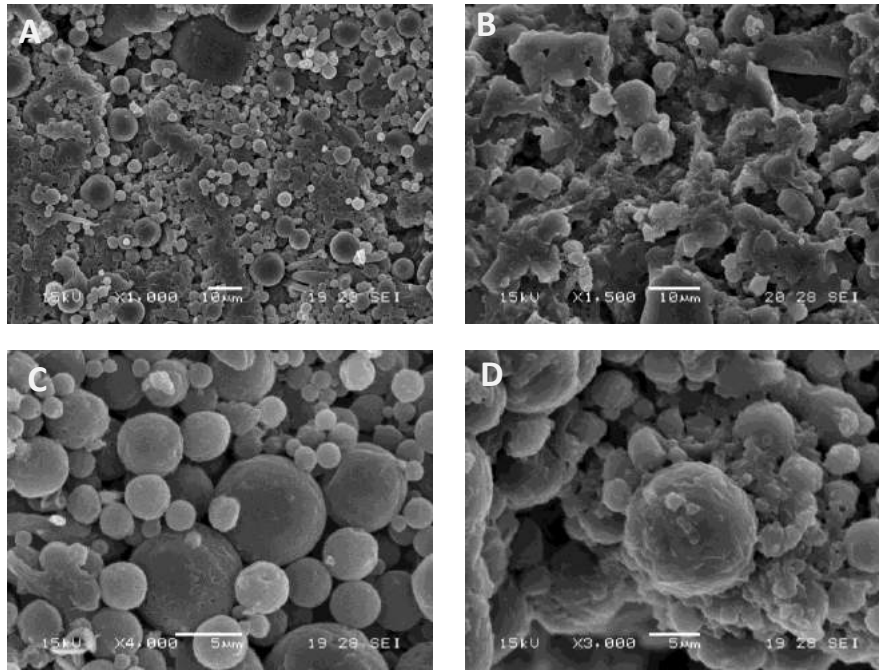


Fig. 5.6. Micrografías SEM de micropartículas de PCL obtenidas con $\Phi = 10$ $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$ y $v = 24000$ rpm: A) PVA 2 % p/v; B) Tween 80 0,2 % p/v; C) PVA 1 % p/v; D) Tween 80 0,1 % p/v.

Las imágenes SEM de las micropartículas obtenidas mediante EHDA se muestran en la Fig. 5.7. Las Fig. 5.7.A y 5.7.B corresponden a las micropartículas de PCL_{sp} , las que presentan forma esférica definida y cierto grado de aglomeración. Por otro lado, las Fig. 5.7.C y 5.7.D, que corresponden a las micropartículas de $\text{PCL}_{\text{E}_{\text{sp}}}$, indican una notable disminución de la aglomeración de las partículas al incorporar el agente terapéutico. La morfología de las partículas evidencia deformaciones que presentan zonas cóncavas y convexas, diferentes a la superficie lisa observada en las partículas PCL_{sp} . Estos resultados concuerdan con los reportados en bibliografía, donde se reporta que la incorporación de un agente terapéutico modifica la velocidad de evaporación del solvente durante la formación de las partículas poliméricas [42]. Por otro lado, estudios previos reportados muestran la posibilidad de controlar la morfología y porosidad de la superficie de las partículas, mediante el control de la velocidad de evaporación del solvente [43]. Estas modificaciones en superficie, permiten obtener partículas con mayor área superficial y menor densidad, lo que resulta en una gran potencialidad para

aplicaciones de administración de agentes terapéuticos en terapias pulmonares [44, 45].

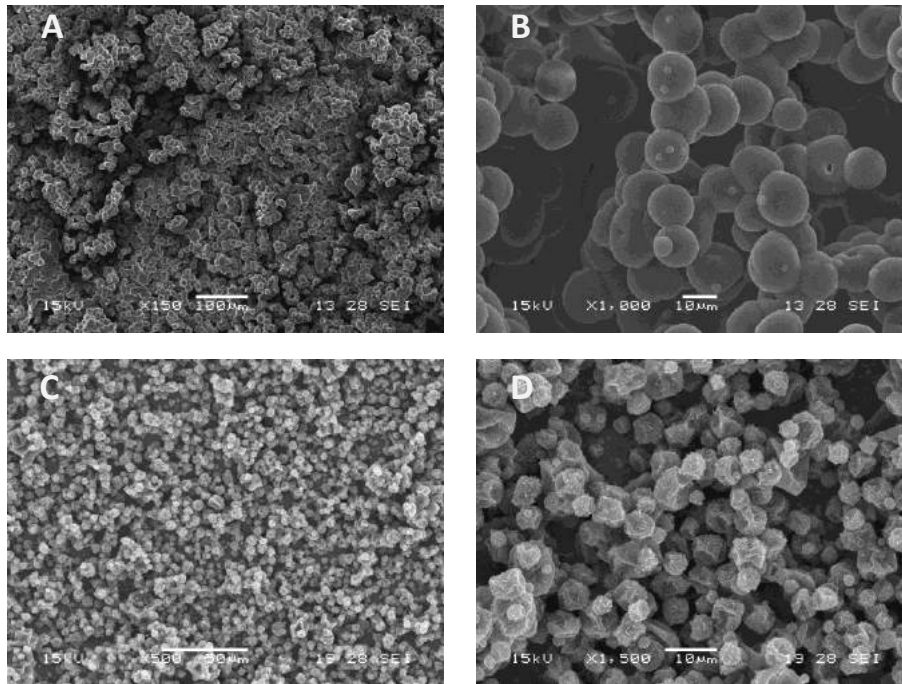


Fig. 5.7. Micrografías SEM de micropartículas de PCL: A) PCL_{sp} (150X); B) PCL_{sp} (1000X); C) PCLE_{sp} (150X); D) PCLE_{sp} (1500X).

La Tabla 5.1 muestra los valores de diámetro medio de partícula ($D_m \pm$ d.e.), los valores de potencial Z y los valores correspondientes de índice de polidispersidad (PDI). Los resultados indican que las micropartículas de PCL_{sp} y PCLE_{sp} poseen mayor tamaño medio (aproximadamente 400 nm) que las obtenidas mediante emulsión. En ambas técnicas la incorporación de embelina produjo un incremento en el diámetro medio de las partículas. Esta observación coincide con la realizada por algunos autores, que incorporan un agente terapéutico en micro/nanopartículas de PCL, obtenidas por emulsión/liofilización [46] y EHDA [47]. Sin embargo, otros autores han observado una disminución del tamaño de partícula al incorporar un agente terapéutico en micro y nanopartículas preparadas a partir de diferentes polímeros biodegradables mediante las mismas técnicas aquí descritas. [43, 42].

El índice PDI indica la polidispersidad o la desviación en la distribución de tamaño de partícula. De modo tal, que las muestras monodispersas tienen

valores de PDI bajos, mientras que los valores más altos de PDI indican una distribución de tamaño de partícula menos estrecho y la naturaleza polidispersa de la muestra. El rango usual de valores de PDI es 0-0,05 (monodispersa estándar), 0,05-0,08 (prácticamente monodispersa), 0,08-0,7 (polidispersidad de rango medio), y por encima de 0,7 (muy polidispersa) [48]. Los valores de PDI indican que las PCLem y PCLEem poseen distribuciones prácticamente monodispersas (0,06) y polidispersas de rango medio (0,11), respectivamente. Por otro lado, las partículas PCLsp y PCLEsp poseen valores de PDI inferiores a 0,04, lo que indica distribuciones monodispersas estándar. Por lo tanto, EHDA permitió obtener micropartículas con una distribución de tamaños menos polidispersa.

En los sistemas de liberación de agentes terapéuticos para terapias pulmonares el diámetro de las micro/nanopartículas y su distribución resultan de gran importancia. Las partículas con diámetros en el intervalo de 1 a 5 μm pueden alcanzar zonas alveolares profundas dentro del pulmón. Las partículas PCLE_{sp} presentaron un diámetro medio y distribución (Tabla 5.1) que resultan favorables para aplicaciones como sistemas de administración por vía inhalatoria [49].

El valor de potencial Z se refiere al potencial de las partículas en superficie, y se relaciona directamente con su estabilidad. Este potencial depende de la composición de superficie, como así también por los grupos funcionales presentes o especies iónicas adsorbidas en la superficie de las partículas, como consecuencia de su interacción con el medio de dispersión [50]. Los valores de potencial Z elevados (positivos o negativos) resultan importantes para conseguir una mayor estabilidad físicoquímica de las partículas, dado que las fuerzas repulsivas presentes evitan la agregación. Como se puede observar en la Tabla 5.1, las partículas sin embelina exhiben potencial Z cercano a cero, lo que indica una pobre estabilidad de la dispersión. Sin embargo, la estabilidad mejora en gran medida luego de la incorporación de embelina en ambos tipos de partículas. Esto se traduce en un nivel de agregación prácticamente nulo como lo revelan los elevados valores de potencial Z y las micrografías SEM (Fig. 5.6.C y 5.7.D).

Por lo expuesto anteriormente, y dados los cambios de potencial Z de las micropartículas al incorporar embelina, se efectuaron estudios de espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier de las partículas empleando reflectancia total atenuada (ATR).

Tabla 5.1. Diámetro medio, potencial Z e índice de polidispersidad de micropartículas.

Muestra	D _m (± d.e.) (nm)	Potencial Z (± d.e.)	PDI
PCL _{em}	396,18 ± 92,32	-15,80 ± 0,49	0,06 ± 0,010
PCL _{sp}	679,20 ± 86,20	-1,74 ± 0,12	0,11 ± 0,020
PCLE _{em}	858,00 ± 294,50	-34,10 ± 2,40	0,03 ± 0,004
PCLE _{sp}	1209,00 ± 185,50	-49,22 ± 2,88	0,04 ± 0,004

5.5.2. Propiedades térmicas y cristalinidad de micropartículas

En la Fig. 5.8 se muestran los termogramas de DSC correspondientes a las micropartículas con embelina, PCLE_{em} y PCLE_{sp}, y la Tabla 5.2 muestra los resultados de las propiedades térmicas.

Como se puede observar en los termogramas, la cristalinidad de embelina en las partículas PCLE_{sp} y PCLE_{em} es despreciable o al menos no puede detectarse mediante DSC. Esto indica que la embelina posee una alta capacidad para mezclarse en la matriz de PCL partiendo de ambos en solución. La compatibilidad de la mezcla PCL-embelina está asociada a la estructura química de la cadena hidrocarbonada lineal presente en la embelina y la estructura química de la PCL. Por otro lado, en las micropartículas obtenidas por ambas técnicas, la cristalinidad de PCL disminuyó ligeramente con respecto al pellet de PCL, encontrándose en valores entre el 44 y 48 %. Esta disminución está asociada a la naturaleza del proceso de EHDA, en donde el microchorro de solución da lugar a micropartículas que solidifican por evaporación del solvente durante el tiempo que se recorre el espacio entre la boquilla y el colector. El proceso de cristalización tiene lugar en un tiempo muy corto y confinado en las dimensiones de las partículas y aun en esas condiciones la PCL continúa presentando una apreciable capacidad para cristalizar.

Tabla 5.2. Propiedades térmicas de embelina, PCL, PCLE_{em} y PCLE_{sp}

Muestra	T _m (°C)	ΔH _{mPCL} (J.g ⁻¹)	X _{cPCL} (%)	ΔH _{mE} (J.g ⁻¹)	X _{ce} (%)
PCL pellet	65,6	87,86	59,3	-	-
PCL _{em}	60,5	57,93	43,0	-	-
PCL _{sp}	59,0	70,69	47,7	-	-
Embelina	81,7; 87,1 145,8	-	-	63,45 129,68	100
PCLE _{em}	59,0	58,80	43,7	-	-
PCLE _{sp}	58,6	66,23	47,6	-	-

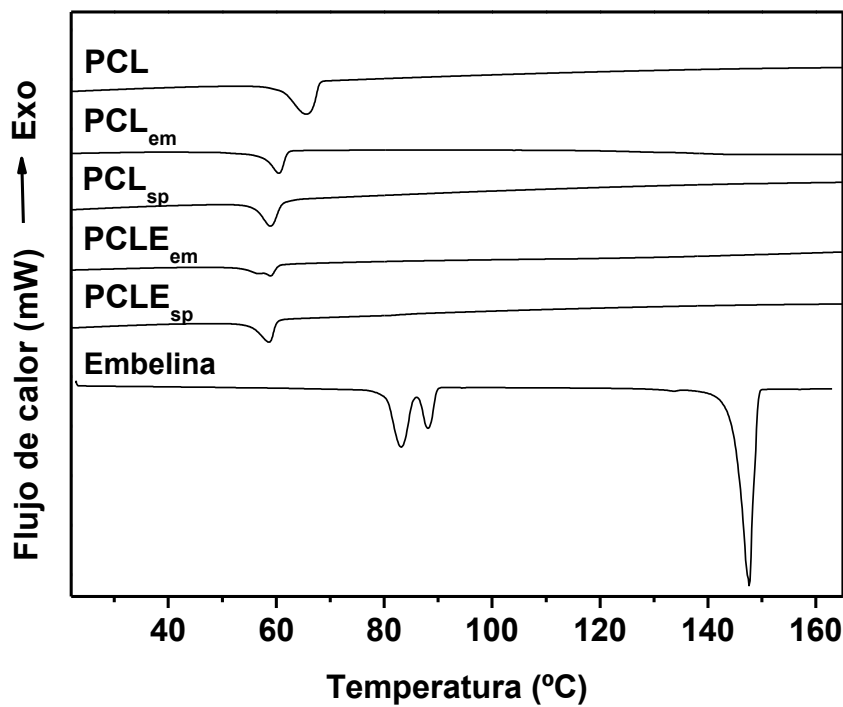


Fig. 5.8 Termogramas de DSC correspondientes a embelina, PCL y micropartículas de PCL_{em}, PCL_{sp}, PCLE_{em} y PCLE_{sp}.

En la Fig. 5.9 se muestran los difractogramas obtenidos mediante DRX, tanto de embelina, como de todas las micropartículas. El difractograma de embelina muestra picos agudos característicos, en $2\theta = 5,81^\circ$; $11,70^\circ$; $14,63^\circ$; $17,59^\circ$; $29,53^\circ$; $32,63^\circ$ y $35,69^\circ$. Sin embargo, es notable la ausencia de estos picos al incorporar embelina en las micropartículas obtenidas por emulsión y EHDA. Esto indica que el agente terapéutico no presenta un ordenamiento

crystalino una vez dispersado en la matriz polimérica de PCL, tal como se observó en el análisis térmico efectuado por DSC. La embelina podría formar agregados amorfos tanto en la matriz polimérica como en regiones de la superficie de las partículas. Si bien la ausencia de cristales resulta conveniente para favorecer el mezclado y su liberación al medio por difusión a través de la matriz polimérica, la presencia de embelina en superficie podría producir una liberación excesiva durante las primeras horas de interacción con el medio biológico.

Los picos presentes en los difractogramas de las micropartículas corresponden con los picos característicos de PCL ($2\theta = 21,40^\circ$ y $23,75^\circ$).

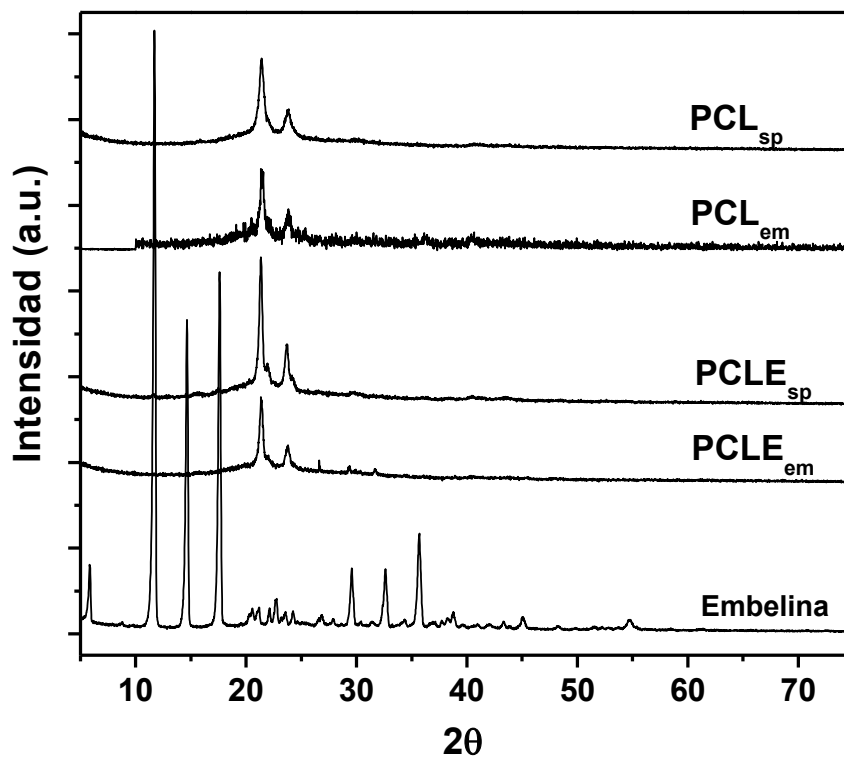


Fig. 5.9. Difractogramas de rayos X de embelina, PCL_{sp}, PCL_{em}, PCLE_{sp} y PCLE_{em}

5.5.3. Caracterización de la composición superficial

El estudio de la composición superficial de las micropartículas se realizó para establecer la relación de la química superficial con los valores de potencial Z y su estabilidad fisicoquímica. En la Fig. 5.10 se muestran los espectros de ATR-FTIR característicos de embelina, PVA, PCL y de las partículas PCL_{em}, PCL_{sp}, PCLE_{em} y PCLE_{sp}.

El espectro de embelina muestra picos característicos a 3300 cm⁻¹ (νO-H); 2918 cm⁻¹ y 2848 cm⁻¹ (ν_aC-H y ν_sC-H en CH₂), y 1612 cm⁻¹ (νC=C), 1462 cm⁻¹ (δC-H en -CH₂), 1375 cm⁻¹ (δC-H en -CH₃), 1219 cm⁻¹, (νC=O). Por otro lado, el espectro de PCL exhibe las señales típicas a 2943 y 2864 (ν_aC-H y ν_sC-H en CH₂), 1720 cm⁻¹ (νC=O en éster), 1398 cm⁻¹ y 1368 cm⁻¹ (δC-H en CH₂), 1246 cm⁻¹ y 1194 cm⁻¹ (νC-O-C en éster) y 1108 cm⁻¹ (νC-O-C en éter). En el caso de PVA, se observa un pico ancho en la región comprendida entre 3620 y 3000 cm⁻¹ está relacionada con el estiramiento O-H de los enlaces puente de hidrógeno inter e intramoleculares, la región entre 2900 y 2800 cm⁻¹ está asociada a estiramientos C-H de grupos alquilos.

La presencia de estas señales en los espectros correspondientes a las micropartículas PCL_{em} y PCLE_{em} evidencia la presencia de PVA en la superficie de las micropartículas obtenidas mediante emulsión/liofilización, incluso luego de lavados sucesivos. Sahoo *et al.* reportaron que el PVA forma una red interconectada con el polímero en la interfaz de las micropartículas con el medio, afectando tanto las propiedades físicas como la absorción de micro- y nanopartículas en las células [51]. La cantidad de PVA residual en la superficie de las partículas está asociada a la concentración de PVA empleado en la fase acuosa y al tipo de solvente orgánico utilizado en la emulsión. Por otro lado, la presencia de PVA residual influye directamente sobre propiedades tales como, el tamaño de las partículas, su potencial de superficie, el nivel de polidispersidad, la hidrofobicidad y sin dudas sobre el perfil de liberación *in vitro* del agente terapéutico encapsulado. Es decir, que el porcentaje de PVA residual es un parámetro importante que puede utilizarse en la formulación para modelar las propiedades farmacéuticas de las micropartículas [51].

Los espectros de las partículas PCL_{em} y PCL_{sp} , muestran picos característicos asociados a la presencia de embelina en superficie ($3305,4$ y $1614,1$ cm^{-1}). La embelina superficial no sólo podría ser la responsable del cambio de potencial Z respecto de las micropartículas PCL_{em} y PCL_{sp} , sino también producir una liberación rápida durante los ensayos *in vitro*. En las PCL_{sp} la presencia de embelina superficial podría deberse, a la rápida evaporación del solvente asociada a la técnica de EHDA, que impide el reordenamiento cristalino de la PCL, permitiendo la migración de embelina a la superficie de las partículas.

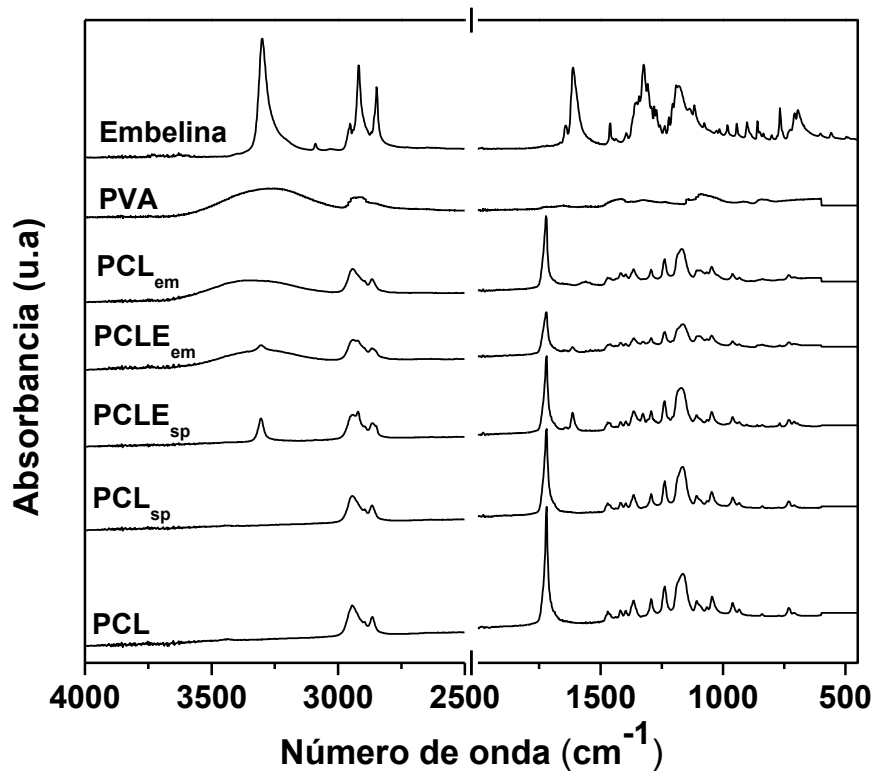


Fig. 5.10. Espectros ATR-FTIR de embelina, PCL, PVA y micropartículas PCL_{sp} , PCL_{em} , $PCLE_{em}$ y $PCLE_{sp}$.

5.5.4. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

En la Tabla 5.3 se muestran los valores correspondientes de masa de embelina presente en las micropartículas por unidad de masa de muestra (M_E), la capacidad de carga, $CC(\%)$, y la eficiencia de encapsulación o carga de

embelina incorporada en las micropartículas, EE(%). Los valores de capacidad de carga indican que la cantidad de embelina contenida en las micropartículas de $PCLE_{sp}$ es un 6,1 % de la masa total de las partículas, mientras que en las $PCLE_{em}$ el valor se reduce al 1,05 % de la masa total de partículas.

Los valores típicos de CC en EHDA disminuyen un 20% de los valores teóricos. Una capacidad de carga elevada siempre es deseable para incrementar la disponibilidad de un agente terapéutico en un área de tratamiento específico con un mínimo uso de un material portador. Sin embargo, esto puede inducir cambios en la morfología de las partículas (principalmente pérdida de la esfericidad durante la contracción y secado de solvente) y alteraciones en los perfiles de liberación. Asimismo, una CC elevada afecta la liberación inicial de agente terapéutico, siendo ésta mayor cuanto mayor es la CC.

Los valores de eficiencia de encapsulación de las micropartículas $PCLE_{sp}$ resultaron de $64,75 \pm 0,01$ %. Dado que la cantidad inicial de embelina en la solución es de 10 % p/p respecto de PCL, el proceso de EHDA permitió una incorporación de embelina de 6,47 % p/p. La técnica de EHDA permite alcanzar en algunos casos valores de EE cercanos al 100% principalmente porque no hay necesidad de una etapa de emulsión (por ejemplo doxorubicina y rodamina en micropartículas de PGLA [20]). La capacidad de carga está relacionada con la eficiencia de encapsulación. Así el incremento en la CC conduce a una disminución en la EE debido al coeficiente de partición del agente en el polímero y el solvente. La solubilidad de equilibrio en el polímero y en el solvente es responsable de la difusión del agente en la fase polimérica. En agentes hidrofóbicos en solventes orgánicos, el incremento de la CC puede conducir a una difusión preferencial hacia el solvente, reduciendo la eficiencia de encapsulación al evaporar conjuntamente el solvente con el agente.

En las micropartículas de $PCLE_{em}$, la EE se reduce a $10,65 \pm 0,01$ %, lo que indica que el proceso de emulsión/liofilización permite una incorporación de embelina de sólo el 1,06 % p/p. En los métodos basados en emulsión, la presencia de fases acuosas y orgánicas puede conducir a una difusión preferencial del agente hacia una u otra fase de acuerdo a las características de hidrofobicidad/hidrofilicidad, reduciendo la EE.

Es común encontrar en la literatura otra forma de expresión de la eficiencia de encapsulación, definida según la ecuación 5.1. De acuerdo a esta forma de expresar la eficiencia, las partículas $PCLE_{sp}$ poseen una EE de 91,83 %. Es decir que si teóricamente la incorporación de embelina inicial es de 10 % p/p respecto de PCL, en el proceso de EHDA la incorporación de embelina sería de 9,18 % p/p, es decir, casi completa. Resulta evidente que este valor sobreestima la eficiencia al considerar que la masa de polímero permanece constante antes y después del proceso, sin considerar las posibles pérdidas durante el proceso de preparación de las micropartículas. A fines comparativos, siguiendo esta última definición de EE se han publicado valores para micropartículas de PCL con Taxol (> 90%) [52], micropartículas de PCL con Paclitaxel (80 %) [53] y nanopartículas de PCL con β -oestradiol (89 %) [47]. .

Tabla 5.3. Contenido de embelina incorporada en micropartículas de PCLE, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

Micropartículas	ME (\pm d.e.) (mg.g ⁻¹)	CC (\pm d.e.) (%)	EE (\pm d.e.) (%)
PCLE _{em}	10,54 \pm 0,89	1,05 \pm 0,14	10,65 \pm 0,01
PCLE _{sp}	60,81 \pm 0,79	6,08 \pm 0,13	64,75 \pm 0,01

5.6. Estudio del proceso de liberación de embelina en micropartículas de PCLE

5.6.1 Efecto del pH del medio

La Fig. 5.11 muestra los perfiles de liberación de embelina de las micropartículas de $PCLE_{em}$ y $PCLE_{sp}$ en PBS (pH = 7,4) y PCB (pH = 5,0) ambos a 37°C. A fin de analizar el efecto del pH del medio en el proceso de liberación de embelina, en las Fig. 5.12 y 5.13 se grafican por separado los perfiles de liberación obtenidos a partir de las micropartículas $PCLE_{em}$ y $PCLE_{sp}$ en ambas soluciones reguladoras.

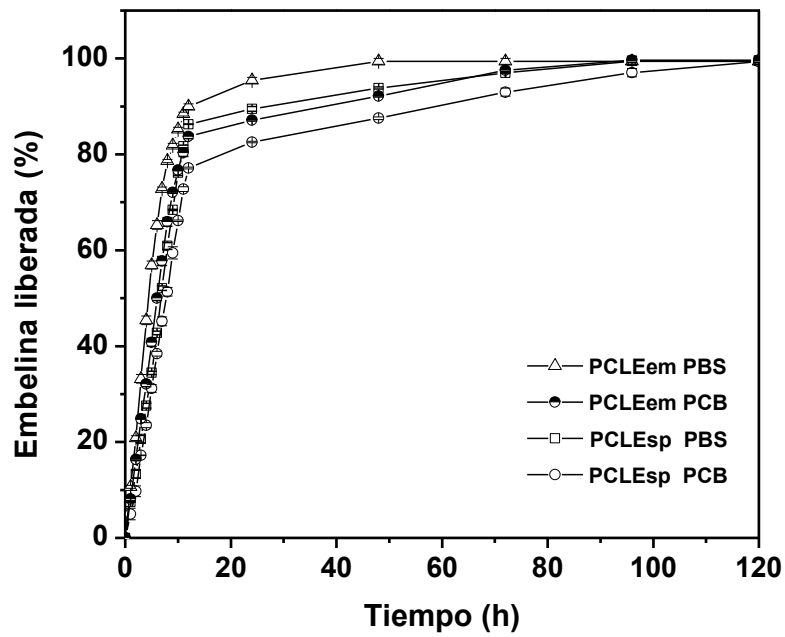


Fig. 5.11. Perfiles de liberación de embelina de micropartículas PCLE_{em} y PCLE_{sp} en PBS y PCB.

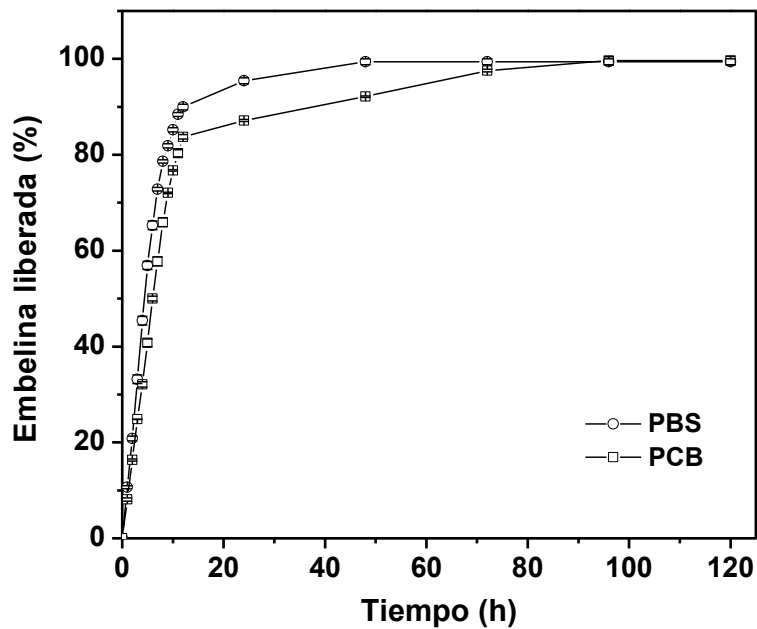


Fig. 5.12. Perfiles de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{em} en PBS y PCB

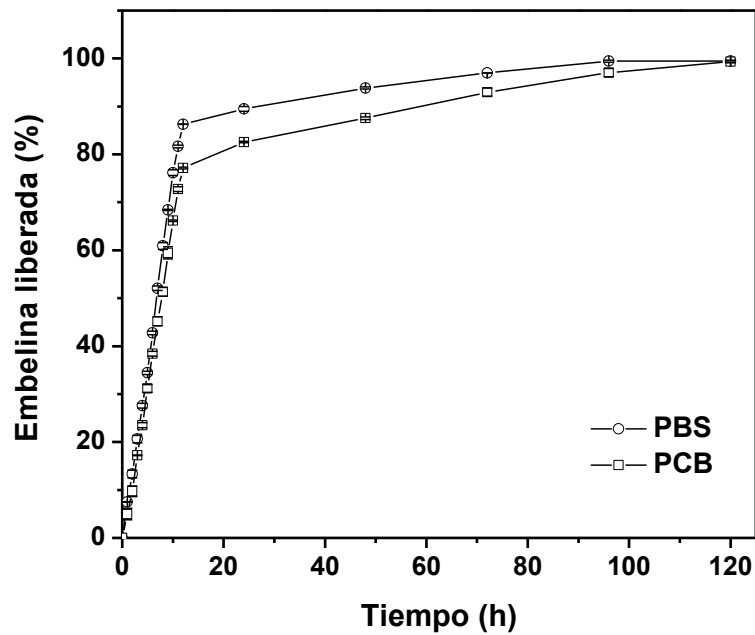


Fig. 5.13: Perfiles de liberación de embelina de micropartículas de $PCLE_{sp}$ en PBS y PCB.

Los perfiles de liberación de las micropartículas de $PCLE_{em}$ y $PCLE_{sp}$ en ambos medios mostraron que la embelina puede liberarse de las micropartículas hidrofóbicas de PCL a la solución acuosa. Como en el caso de las matrices nanofibras, el proceso de liberación presentó dos etapas diferentes. La primera etapa consiste en una liberación inicial rápida, en la cual la liberación ocurre por disolución de embelina presente en la superficie y regiones próximas a la superficie de las micropartículas. La segunda etapa consiste en una fase de liberación lenta, asociada a mecanismos difusivos de las moléculas de embelina presentes en el interior de las micropartículas.

Los perfiles de liberación de embelina de las micropartículas $PCLE_{em}$ en PBS mostraron una etapa inicial de orden cero durante 6 h en donde se libera un 65% de embelina, alcanzando la liberación completa a las 48 h (2 días). En PCB la etapa inicial se prolongó hasta las 8 h, tiempo en el cual se liberó la misma cantidad de agente terapéutico que en PBS, mientras que la liberación completa se produjo luego de 96 h (4 días).

Para las micropartículas $PCLE_{sp}$ el análisis del perfil de liberación de embelina en PBS revela que la etapa inicial de orden cero se mantuvo hasta

las 10 h (76 %), alcanzando la liberación completa a las 120 h (5 días). La etapa inicial en PCB se prolongó hasta las 12 h, para llegar también a aproximadamente el mismo valor (77%). El proceso se completó también a las 120 h (5 días).

En base a estos resultados, la etapa inicial de liberación rápida presentó una evidente dependencia del pH en ambos tipos de micropartículas, siendo más atenuada en PCB (pH = 5) que en PBS (pH = 7,4).

Los mecanismos de difusión responsables de la etapa de liberación lenta, están influenciados por las interacciones de embelina y PCL, descartando efectos de la solubilidad de embelina en los medios de liberación. Debido a que el límite de solubilidad de embelina en medio acuoso es $130 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de acuerdo con Patel *et.al.* [54], se puede suponer que el equilibrio entre embelina y las soluciones reguladoras no se alcanzó en ninguno de los medios para ambos tipos de micropartículas, dado que la cantidad máxima liberada no superó el 7 % de la solubilidad. Por lo tanto, ambos sistemas (PCLE_{em} y PCLE_{sp}) se mantuvieron en condiciones alejadas de la saturación o condiciones de perfecta solubilidad del agente activo (*sink conditions*) durante todo el período de la liberación.

5.6.2. Efecto del método de obtención

Para analizar la influencia del tipo de micropartícula en el proceso de liberación de embelina, se graficaron por separado las curvas en PBS y PCB para ambas micropartículas (Fig. 5.14 y 5.15) respectivamente.

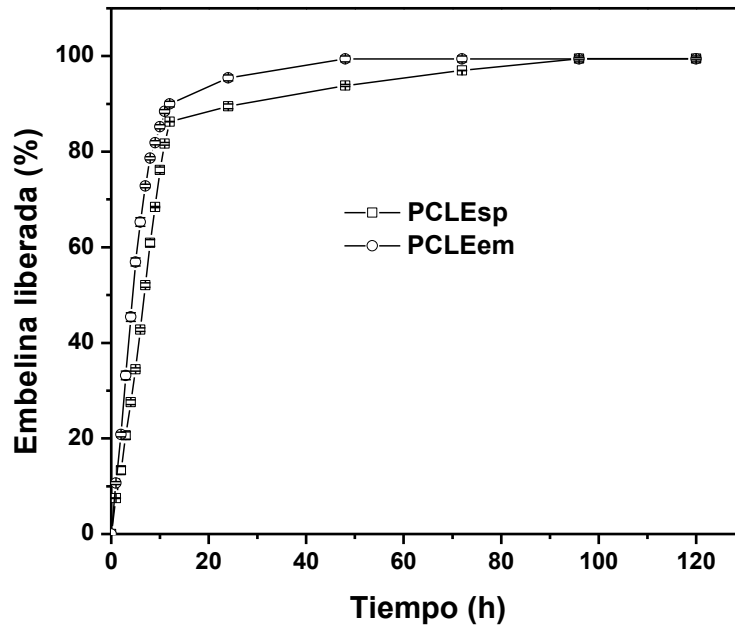


Fig. 5.14: Perfiles de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{em} y PCLE_{sp} en PBS (pH = 7,4)

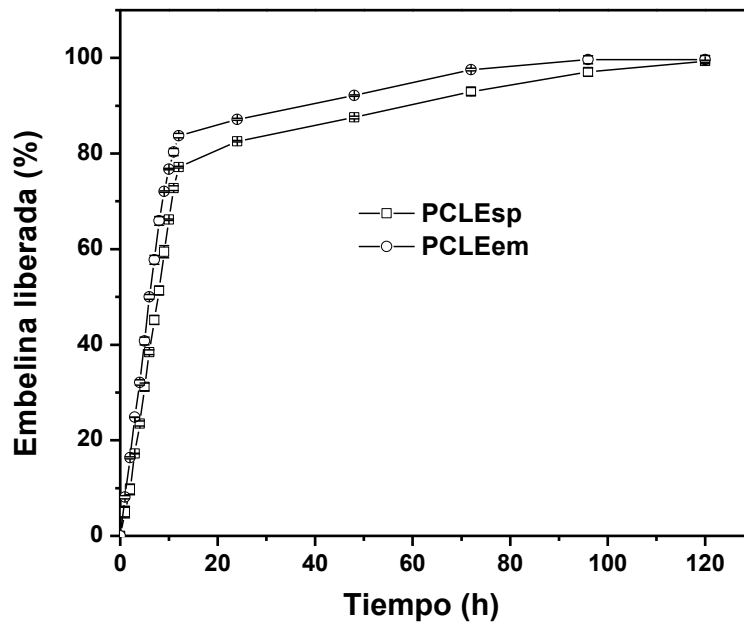


Fig. 5.15: Perfiles de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{em} y PCLE_{sp} en PCB (pH = 5)

La etapa inicial de liberación rápida presentó una dependencia con la técnica de obtención de las micropartículas, siendo más atenuada la liberación de embelina para PCLE_{sp} frente a PCLE_{em} a pesar de poseer PCLE_{sp} la mayor CC y EE. Este comportamiento se mostró en ambos medios. La mayor cristalinidad de PCL (5 %) en PCLE_{sp} podría dificultar la difusión de las moléculas de embelina a través de la matriz de PCL.

Los valores observados están asociados a una combinación de dos fenómenos, por un lado la disolución de embelina presente en la superficie y por otro los mecanismos de difusión de embelina localizada en las zonas cercanas a la superficie.

Como se comentó en la sección 5.5.3, las micropartículas de PCLE_{em} poseen PVA residual en la superficie. Sahoo *et al.* encontraron que las macromoléculas de PVA pueden hincharse produciendo un retardo en la liberación de seroalbúmina bovina asociada a la formación de una barrera al proceso difusional [51]. Sin embargo, en PCLE_{em} el proceso de liberación ocurrió con mayor facilidad que en PCLE_{sp}, lo que podría explicarse por mayor afinidad del PVA por el agua y de este modo la mayor capacidad para introducir agua en la partícula. Las micropartículas de PCLE_{em} exhibieron un tiempo de liberación en PBS de 2 días, prácticamente la mitad del tiempo mostrado por el sistema PCLE_{sp}. Por lo tanto, el método de obtención de las partículas resulta determinante en la definición de los perfiles de liberación de embelina en las diferentes soluciones reguladoras.

5.6.4 Análisis de la cinética de liberación

Las Figuras 5.16 a 5.19 muestran los ajustes realizados en las dos regiones que presentaron las curvas de liberación: una etapa de liberación inicial de orden cero y una segunda etapa de liberación difusional en donde se aplicaron los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas. En las Tablas 5.4 y 5.5 se resumen los resultados de las constantes y parámetros de los modelos y el coeficiente de correlación (R^2). La constante A indica la cantidad de embelina liberada en el tiempo de inicio de la etapa difusional (t), K_H es la constante de

Higuchi (ecuación 4.4) y K_{KP} es la constante de Korsmeyer-Peppas y el exponente n de la ecuación de Korsmeyer-Peppas (ecuación 4.5).

Tabla 5.4: Resultados del ajuste de las curvas de liberación de micropartículas de PCLE_{em} y PCLE_{sp} en PBS (pH = 7,4)

Muestra en PBS	Etapa 1 (Orden cero)			Modelo de Higuchi		Modelo de Korsmeyer-Peppas		
	A (%)	T (h)	R ²	K _H (h ^{-1/2}) (d.e.)	R ²	K _{KP} (h ⁻ⁿ) (d.e.)	n (d.e.)	R ²
PCLE _{sp}	76,20	10	0,997	2,559 (0,192)	0,842	6,867 (0,632)	0,265 (0,022)	0,984
PCLE _{em}	65,27	6	0,997	4,339 (0,515)	0,299	14,432 (1,555)	0,203 (0,029)	0,901

Tabla 5.5: Resultados del ajuste de las curvas de liberación de micropartículas de PCLE_{em} y PCLE_{sp} en PCB (pH = 5)

Muestra en PCB	Etapa 1 (Orden cero)			Modelo de Higuchi		Modelo de Korsmeyer-Peppas		
	A (%)	T (h)	R ²	K _H (h ^{-1/2}) (d.e.)	R ²	K _{KP} (h ⁻ⁿ) (d.e.)	n (d.e.)	R ²
PCLE _{sp}	77,20	12	0,998	2,048 (0,076)	0,976	1,027 (0,162)	0,660 (0,036)	0,995
PCLE _{em}	65,93	8	0,999	3,814 (0,312)	0,771	9,936 (0,932)	0,269 (0,023)	0,970

En la etapa de liberación de orden cero, la cantidad de agente liberado (A) es difícil de predecir y controlar, aun cuando este efecto es deseado, y su magnitud y variación con el pH del medio y la técnica de obtención se discutió en las secciones anteriores.

En la etapa de liberación difusional, el modelo de liberación de Korsmeyer-Peppas mostró un ajuste mucho mejor que el modelo de Higuchi (columnas sombreadas en Tablas 5.4 y 5.5) para ambos tipos de partículas y ambos pH. La liberación a partir de micropartículas de PCLE_{sp} presentó el mejor grado de ajuste ($R^2 = 0.984$ y 0.995 en PBS y PCB respectivamente), aunque el modelo de Higuchi mostró un ajuste muy bueno en PCB. Los valores del exponente n para partículas esféricas indican difusión Fickiana para $n = 0,43$, difusión cuasi-Fickiana para $n < 0,43$ y transporte anómalo (no Fickiano) para $0,43 < n < 0,85$.

La liberación de embelina resultó cuasi-Fickiana en todos los casos excepto para PCLE_{sp} en PCB.

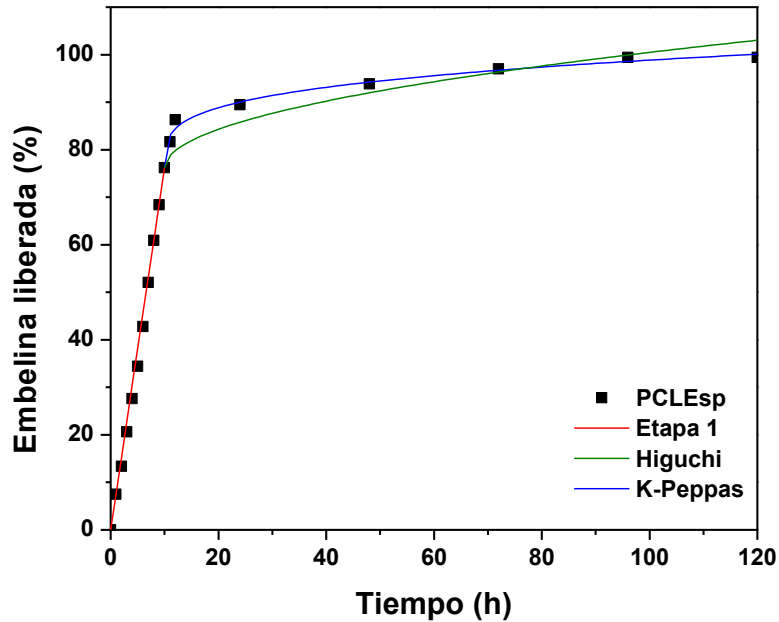


Fig. 5.16. Ajuste de la curva de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{sp} en PBS (pH = 7,4)

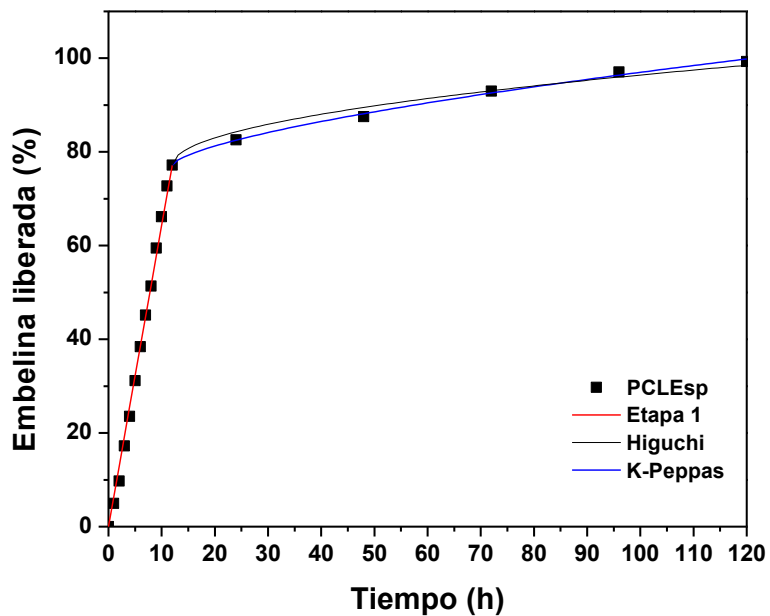


Fig. 5.17. Ajuste de la curva de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{sp} en PCB (pH = 5)

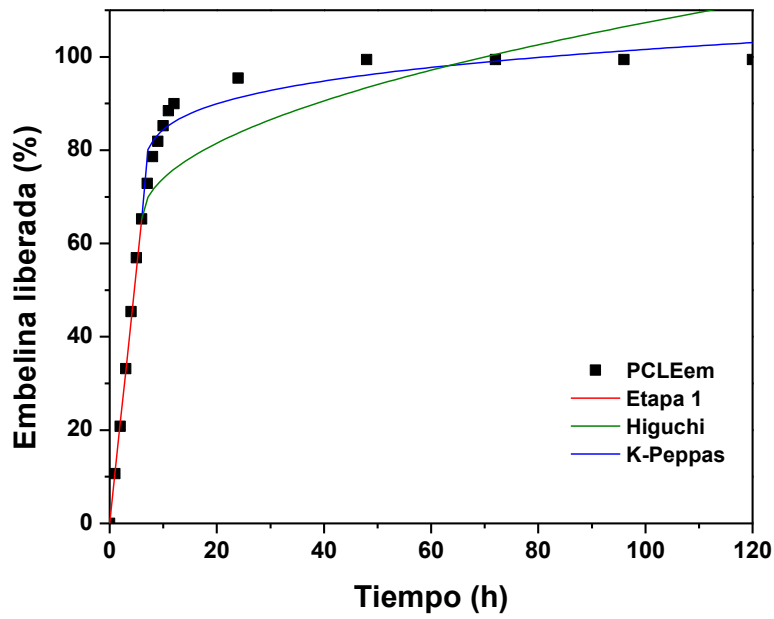


Fig. 5.18. Ajuste de la curva de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{em} en PBS (pH = 7,4)

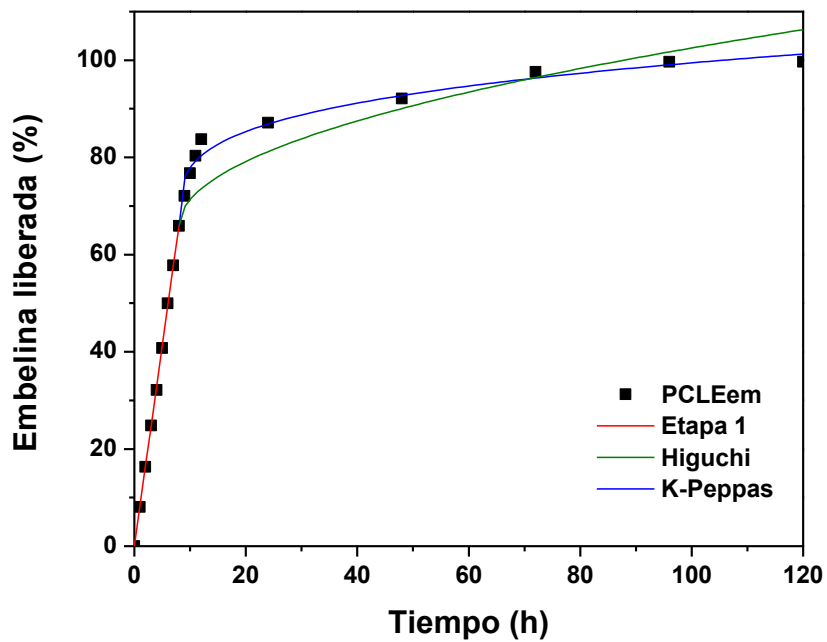


Fig. 5.19. Ajuste de la curva de liberación de embelina de micropartículas de PCLE_{emb} en PCB (pH = 5)

5.7. Conclusiones parciales

En este capítulo se describe la preparación de micropartículas de PCL con embelina mediante las técnicas de emulsión/liofilización y atomización electrohidrodinámica, así como su caracterización fisicoquímica, térmica y morfológica. Se estudia la cinética de liberación de las micropartículas en dos medios de pH diferente, efectuando el ajuste de las curvas de liberación con los modelos de orden cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas, a partir de los cuales se determinan y analizan los parámetros de ajuste y su relación con los mecanismos de difusión y transporte que tienen lugar durante el proceso. Las técnicas de emulsión/liofilización y atomización electrohidrodinámica permitieron la obtención de micropartículas de PCLE. Las micropartículas PCLE_{sp} presentaron mayor diámetro medio, menor polidispersidad, mayor cristalinidad del polímero, mayor estabilidad, mayor capacidad de carga (6 %) y mayor eficiencia de encapsulación (65 %).

Los perfiles de liberación de las micropartículas de PCLE_{em} y PCLE_{sp} en ambos medios mostraron que la embelina puede liberarse de las micropartículas hidrofóbicas de PCL a la solución acuosa. El proceso de liberación presentó dos etapas diferentes: a) una etapa inicial de liberación rápida caracterizada por una cinética de orden cero por la disolución de embelina presente en la superficie y b) una etapa de liberación lenta asociada a mecanismos difusivos de las moléculas de embelina presentes en el interior de las micropartículas.

El proceso de liberación de embelina *in vitro* mostró una dependencia respecto del pH del medio y de la técnica de procesamiento de las micropartículas. El PVA residual presente en las micropartículas PCLE_{em} influyó en el proceso de liberación, el que ocurrió con mayor facilidad que en PCLE_{sp}. Así, las micropartículas de PCLE_{em} exhibieron un tiempo de liberación en PBS de 2 días, prácticamente la mitad del tiempo que requirió el sistema PCLE_{sp}.

El análisis de la cinética del proceso de liberación indicó que el modelo matemático de liberación de Korsmeyer-Peppas mostró un ajuste mucho mejor que el modelo de Higuchi para ambos tipos de partículas y ambos pH.

Las micropartículas PCLE_{sp} presentaron perfiles de liberación que combinan una liberación inicial rápida que proporciona una dosis elevada (dosis de ataque) con una etapa de liberación controlada. Esta última se debe principalmente al mayor tamaño y área superficial de partícula y la mayor eficiencia de encapsulación. Estas micropartículas resultan altamente atractivas como vectores de administración de embelina por vía inhalatoria para aplicaciones en terapias pulmonares.

5.8. Referencias

- [1] A. Kumari, S. K. Yadav, S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1 - 18, 2010.
- [2] F. Rocha Formiga, E. Ansorena, A. Estella-Hermoso de Mendoza, E. Imbuluzqueta, D. González, MJ. Blanco Prieto, "Nanosistemas a base de poliésteres", de *Nanotecnología farmacéutica, Realidades y Posibilidades Farmacoterapéutica*, V. Jato, Ed., Madrid: Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia, 2009, 41 - 101.
- [3] A. Glen, "The impact of nanotechnology in drug delivery: global development". Market Anal. Future prospects 2005. Available from: <http://www.nanomarkets.com>
- [4] R. S. Raghuvanshi, Y. K. Katare, K. L. Mushir, M. Ali, O. Singh, A. K. Panda, "Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants". *Int. J. Pharm.*, 245, 109 - 121, 2002.
- [5] A. Frank, E. Pridgen, L. K. Molnar, O. C. Farokhzad, "Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles". *Mol. Pharm.*, 5(4), 505 - 515, 2008.
- [6] R. Katara, DK. Majumdar, "Eudragit RL 100-based nanoparticulate system of aceclofenac for ocular delivery". *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, 103, 455 - 462, 2013.
- [7] M. Zamani, M. P. Prabhakaran, S. Ramakrishna, "Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials". *Int. J. of Nanomedicine*, 8, 2997 - 3017, 2013.
- [8] S. Rezende Schaffazick, S. Stanisçuaski Guterres, "Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos". *Qum. Nova*, 5(26), 726 - 737, 2003.
- [9] F. Andrade, D. Rafael, M. Videira, D. Ferreira, A. Sosnik, B. Sarmiento, "Nanotechnology and pulmonary delivery to overcome resistance in infectious diseases". *Adv. Drug Delivery Reviews*, 65, 1816 - 1827, 2013.

- [10] L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette, "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56(11), 1649 - 1659, 2004.
- [11] J. C. Imperiale, G. Bevilacqua, P. de Tarso Vieira e Rosa, A. Sosnik, "Production of pure indinavir free base nanoparticles by a supercritical anti-solvent (SAS) method". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1 - 9, 2013.
- [12] K.P. Seremeta, C. Höcht, C. Taira, P.R. Cortez Tornello, G.A. Abraham, A. Sosnik, "Didanosine-loaded poly(epsilon-caprolactone) microparticles by a coaxial electrohydrodynamic atomization (CEHDA) technique". *J. Mater. Chem. B*, 2014.
- [13] C. Damge, P. Maincent, N. Ulbrich, "Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats". *J. Control. Release*, 117(2), 163 - 170, 2007.
- [14] S.Y. Kim, Y.M. Lee, "Taxol-loaded block copolymer nanosphere composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(epsilon-caprolactone) as novel anticancer drug carriers". *Biomaterials*, 22(13), 1697 - 1704, 2001.
- [15] K.S. Lee, H.C. Chung, S.A. Im, Y.H. Park, C.S. Kim, S.B. Kim, S.Y. Rha, M.Y. Lee, J. Ro, "Multicenter phase II trial of Genoxol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patient with metastatic breast cancer". *Breast Cancer Res. Treat.*, 108(2), 241 - 250, 2008.
- [16] V.R. Shina, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, A. Trehan, "Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview". *International J. Pharm.*, 278, 1 -23, 2004.
- [17] C.R. Müller, S. Schaffazick, A. Pohlmann, L. Freitas, N. Pesce, T. Tavares, "Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization". *Pharmazie*, 11, 864 - 867, 2001.
- [18] L. Ahmed, "Supercritical Fluid Technology", 2010.
- [19] J. Desimone, "Methods for fabricating isolated micro-and nano-structures or imprint lithography". US Patent 8263129 B2, 16 April 2013.
- [20] N. Bock, T.R. Dargaville, M.A. Woodruff, "Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of art". *Progr. Polym. Sci.*, 37, 1510 - 1551, 2012.
- [21] M. Ye, S. Kim, K. Park, "Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles". *J Control Release*, 146, 241 - 260, 2010.
- [22] H. Valo, L. Peltonen, S. Vehvilainen, M. Karjalainen, R. Kostianen, T. Laaksonen, J. Hirvonen, "Electrospray encapsulation of hydrophilic and hydrophobic drugs in poly(L-lactic acid) nanoparticles". *Small*, 5, 1791 - 1798, 2009.
- [23] J.C. Ijsebaert, K.B. Geerse, J.C.M. Marijnissen, J.W.J. Lammers, P. Zanen, "Electro-hydrodynamic atomization of drug solutions for inhalation purposes". *J Appl Physiol*, 91, 2735 - 2741, 2001.
- [24] N. Arya, S. Chakraborty, N. Dube, D.S. Katti, "Electrospraying: a facile technique for synthesis of chitosan-based micro/nanospheres for drug delivery applications". *J Biomed Mater Res B*, 88, 17 - 31, 2209.
- [25] Y.L. Hong, Y.Y. Li, Y.Z. Yin, D.M. Li, G.T. Zou, "Electrohydrodynamic atomization of quasi-monodisperse drug-loaded spherical/wrinkled". *J*

Aerosol Sci, 39, 525 – 536., 2008.

- [26] T. Ciach, "Microencapsulation of drugs by electro-hydro-dynamic atomization". *Int J Pharm*, 324, 51 – 55, 2006.
- [27] J.W. Xie, R.S. Tan, C-H. Wang, "Biodegradable microparticles and fiber fabrics for sustained delivery of cisplatin to treat C6 glioma in vitro". *J Biomed Mater Res A*, 85, 897 – 908, 2008.
- [28] H.M. Nie, Y.L. Fu, C.H. Wang, "Paclitaxel and suramin-loaded core/shell microspheres in the treatment of brain tumors". *Biomaterials*, 31, 8732 – 8740, 2010.
- [29] M. Trotta, R. Cavalli, C. Trotta, R. Bussano, L. Costa, "Electrospray technique for solid lipid-based particle production". *Drug Dev Ind Pharm*, 36, 431 – 438, 2010.
- [30] R. Cavalli, A. Bisazza, R. Bussano, M. Trotta, A. Civra, D. Lembo, E. Ranucci, P. Ferruti, "Poly(amidoamine)-cholesterol conjugate nanoparticles obtained by electrospraying as novel tamoxifen delivery system". *J Drug Deliv*, 587 - 604, 2011.
- [31] J.W. Xie, C.H. Wang, "Encapsulation of proteins in biodegradable polymeric microparticles using electrospray in the Taylor Cone-Jet mode". *Biotechnol Bioeng*, 87, 1278 – 1290, 2007.
- [32] V. Lassalle, M.L. Ferreira, "PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation". *Macromol Biosci*, 7, 767 – 783, 2007.
- [33] S. Chakraborty, I.C. Liao, A. Adler, K.W. Leong, "Electrohydrodynamics: a facile technique to fabricate drug delivery systems". *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 1043 – 1054, 2009.
- [34] Y.K. Hwang, U. Jeong, E.C. Cho, "Production of uniform-sized polymer core-shell microcapsules by coaxial electrospraying". *Langmuir*, 24, 2446 – 2451, 2008.
- [35] S. Park, S. Hwang, J. Lee, "pH-responsive hydrogels from moldable composite microparticles prepared by coaxial electro-spray drying". *Chem Eng J*, 24, 348 – 357, 2011.
- [36] Z. Ahmad, H.B. Zhang, U. Farook, M. Edirisinghe, E. Stride, P. Colombo, "Generation of multilayered structures for biomedical applications using a novel tri-needle coaxial device and electrohydrodynamic flow". *J R Soc Interface*, 5, 1255 – 1261, 2008.
- [37] W. Kim, S.S. Kim, "Multishell encapsulation using a triple coaxial electrospray system". *Anal Chem*, 82, 4644 – 4647, 2010.
- [38] H. Nie, Z. Dong, D.Y. Arifin, Y. Hu, C.H. Wang, "Core/shell microspheres via coaxial electrohydrodynamic atomization for sequential and parallel release of drugs". *J Biomed Mater Res A*, 95A, 709 – 716, 2009.
- [39] G. Healthcare, "Microcarrier cell culture—principles and methods" de *Biosciences GECA*, Glasgow, 2005.
- [40] J.W. Xie, C.H. Wang, "Electrospray in the dripping mode for cell microencapsulation". *J Colloid Interface Sci*, 312, 247 – 255, 2007.
- [41] J. Vanderhoff, M. El-Aaser, J. Ugelstad, "Polymer Emulsification", US Patent 4 1777-177, 1979.

- [42] J. Xie, L. K. Lim, Y. Phua, J. Hua, C-H. Wang, "Electrohydrodynamic atomization for biodegradable polymeric particle production". *J. Colloid Interface Sci*, 302(103 - 112), 2006.
- [43] J. Yao, L.K. Lim, J. Xie, J. Hua, C-H. Wang, "Characterization of electro spraying process for polymeric particle fabrication". *Aerosol Sci.*, 39, 987 – 1002, 2008.
- [44] D.A. Edwards, J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. Ben-Jebria, M.L. Eskew, J. Mintzes, D. Deaver, N. Lotan, R. Langer, "Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery". *Science*, 276 , 1868 - 1871, 1997.
- [45] D.A. Edwards, A. Ben-Jebria, R. Langer, "Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles". *J. Appl. Physiol.*, 84 (2), 379 - 385, 1998.
- [46] A.F. Abdel Wahab, A. K. Hussein, K.A. Khaled, O.A.A. Ahmed, "Meloxicam Depot Parenteral Bio-Degradable Microspheres: Preparation, Characterization and In-Vivo Evaluation". *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 21(2), 38 - 45, 2013.
- [47] M. Enayati, Z. Ahmad, E. Stride, M. Edirisinghe, "Size mapping of electric field-assisted production of polycaprolactone particles". *J. R. Soc. Interface*, 1 - 10, 2010.
- [48] S. Wolfgang, "Sample preparation in light scattering from polymer solution and nanoparticle dispersions". Springer Berlin Heidelberg GmbH & Co. K., 2007, P4, 3 – 4.
- [49] J.C. Ijsebaert, K.B. Geerse, J.C.M. Marijnissen, J.W.J. Lammers, P. Zanen, "Electrohydrodynamic atomization of drug solutions for inhalation purpose". *Journal of Applied Physiology*, 91, 2735 – 2741, 2001.
- [50] S.R. Schaffazick, S.S. Guterres, L. Freitas, A.F. Pohlmann, "Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration". *Quim. Nova*, 5(26), 726 - 737, 2003.
- [51] S.K. Sahoo, J. Panyama, S. Prabhaa, V. Labhassetwara, "Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-coglycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake". *Journal of Controlled Release*, 82, 105 – 114, 2002.
- [52] L. Ding, T. Lee, C-H Wang, "Fabrication of monodispersed Taxol-loaded particles using electrohydrodynamic atomization". *Journal of Controlled Released*, 102, 395 - 413, 2005.
- [53] J. Xiea, J. C.M. Marijnissenb, C-H Wang, "Microparticles developed by electrohydrodynamic atomization for the local delivery of anticancer drug to treat C6 glioma in vitro". *Biomaterials* , 27, 3321 – 3332, 2006.
- [54] R.K. Patel, K. Pundarikakshudu, M. Momin, M.M. Patel, "Studies on formulation and in vitro dissolution of embelin tablets". *Indian J. Pharm. Sci.*, 68, 227 – 230, 2006.

Capítulo 6

Conclusiones finales y trabajos futuros

Conclusiones Finales

Las matrices electrohiladas presentan características de notable interés para el desarrollo de sistemas para administración vectorizada de agentes terapéuticos e ingeniería de tejidos.

Las matrices fibrosas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) obtenidas mediante tecnología de electrohilado de soluciones exhiben fibras uniformes, orientadas al azar, con diámetros medios de fibra en el orden micro y nanométrico. Las características estructurales de las matrices evidencian en todos los casos una distribución de tamaño de poro unimodal. La porosimetría de extrusión de líquidos resulta una técnica muy adecuada para el estudio de la caracterización estructural de matrices micro y nanofibrosas.

La incorporación de embelina, agente terapéutico de origen natural que posee un amplio espectro de actividades biológicas como agente antimicrobial, leishmanicida, cicatrizante, antioxidante, antiparasitario y analgésico, en matrices fibrosas de PCL puede llevarse a cabo eficientemente mediante la tecnología de electrohilado.

Las condiciones experimentales empleadas permiten la obtención de las matrices electrohiladas con una morfología de fibras uniformes con diámetros que dependieron del tipo de solvente empleado. La mezcla de solventes DCM/DMF conduce a la formación de nanofibras de PCL con mejor calidad de la dispersión de embelina, la que se encuentra amorfa en la matriz de PCL. El contenido de embelina no modifica la morfología y el diámetro medio de las nanofibras, aunque produce un incremento en la cristalinidad de PCL. El análisis de la superficie permite determinar la presencia de embelina en la región superficial y se infiere que ésta se encuentra en estado amorfo.

Las matrices poliméricas micro/nanofibrosas preparadas con diferentes concentraciones de embelina y estructuras multicapa, conforman sistemas con contenido de agente terapéutico variable y capacidad para liberar embelina en

forma controlada. Los niveles de liberación inicial y el perfil de liberación del sistema dependen del pH del medio y del contenido de embelina presente en las matrices nanofibrosas.

La formación de estructuras bicapa y tricapa con diferentes espesores resulta una estrategia apropiada para modular los perfiles de liberación *in vitro* de embelina y al mismo tiempo disminuir el efecto de liberación inicial rápida en matrices de PCL con embelina. La matriz nanofibrosa de PCL introducida como recubrimiento de una matriz cargada con embelina no constituye una barrera impermeable al proceso de liberación. Los resultados de los estudios cinéticos evidencian que es posible modular el perfil de liberación del sistema dependiendo del número y espesor de capas introducidas en la matriz base que actúa como reservorio de embelina.

Las técnicas de emulsión/liofilización y atomización electrohidrodinámica (EHDA) permiten la obtención de micropartículas de PCL con embelina. Las micropartículas preparadas por EHDA poseen mayor estabilidad, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación. El proceso de liberación de embelina *in vitro* depende del pH del medio y de la técnica de procesamiento de las micropartículas. El análisis de la cinética del proceso de liberación indica que el modelo matemático de liberación de Korsmeyer-Peppas se ajusta muy bien para ambos tipos de partículas en los pH estudiados. Las micropartículas preparadas por EHDA presentan perfiles de liberación que combinan una liberación inicial rápida, que proporciona una dosis elevada, seguida por una liberación sostenida. Estas micropartículas resultan de gran interés para aplicaciones como sistemas de administración de embelina por vía inhalatoria para aplicaciones en terapias pulmonares.

Los sistemas poliméricos de tipo matricial fibroso o particulado desarrollados y estudiados en esta tesis poseen una importante potencialidad como sistemas de liberación controlada de embelina.

Trabajos de investigación futuros

El trabajo realizado deja abierta la posibilidad de continuar profundizando algunos de los temas estudiados.

La obtención de matrices nanofibrosas con mayor tamaño de poro, para facilitar los procesos de infiltración y migración celular en matrices con diámetro de fibras del orden de las fibras de la matriz extracelular nativa, constituye uno de los desafíos actuales en el campo de las matrices poliméricas para regeneración de tejidos. En este sentido, se prevé la preparación de matrices de PCL con embelina con tamaño de poro en el orden de las centenas de micrómetros y su caracterización a través de porosimetría de extrusión de líquidos.

La generación de estructuras nanofibrosas con uno o más agentes terapéuticos encapsulados en un núcleo, o la formación de estructuras concéntricas con fibras de distintos materiales y agentes, permite el desarrollo de nuevos sistemas de liberación múltiple para el tratamiento de diferentes afecciones. Se prevé la incorporación de embelina en el núcleo de nanofibras de PCL, y su combinación con otros agentes terapéuticos y materiales poliméricos, a fin de preparar sistemas de liberación múltiple con control preciso de cada etapa de liberación.

La preparación de micro- y nanopartículas mediante EHDA con agentes terapéuticos incorporados en el núcleo, y la generación de estructuras particuladas con multicapas funcionalizadas, se presentan como nuevos sistemas vectoriales complejos para el tratamiento efectivo de diversas enfermedades. Se prevé la preparación de micro y nanopartículas de PCL con embelina encapsulada en el núcleo, e incorporación de capas de diferentes materiales poliméricos y agentes, a fin de obtener sistemas de vectorización particulados de liberación múltiple y controlada.

La posibilidad de incorporar micropartículas con embelina producidas por EHDA distribuidas en matrices nanofibrosas de PCL permite la formación de

nuevos sistemas y diferentes formas de dosificación. Disponiendo actualmente del conocimiento de las técnicas de obtención y de las propiedades de ambos componentes, la generación de estas matrices resulta altamente factible de concretarse.

El estudio de los perfiles de liberación de agentes terapéuticos a partir de nuevos sistemas poliméricos micro/nanofibrosos requiere en muchos casos del ajuste de modelos que contemplen todos los complejos mecanismos involucrados en el transporte de masa y predigan la cinética de liberación. El desarrollo de sistemas con estructuras más sofisticadas sin dudas requiere una observación detallada del proceso y la propuesta de modelos que describan y predigan el comportamiento completo en diferentes condiciones.

La evaluación biológica de los sistemas matriciales y particulados tanto *in vitro* e *in vivo* resulta un aspecto fundamental que debe ser considerado. En este sentido, la determinación de la citotoxicidad, actividad antimicrobial y antifúngica proporciona una visión más completa de la potencialidad terapéutica de estos sistemas. La amplia variedad de propiedades biológicas de la embelina puede dar lugar a nuevas formas de vehiculización, las que pueden explorarse con los materiales y técnicas empleados en esta tesis.

Capítulo 7

Producción científica

Los resultados relacionados con distintos aspectos de esta tesis doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones en congresos:

Publicaciones científicas en revistas internacionales

1. **P.R. Cortez Tornello**, G.E. Feresin, A.Tapia, I.G. Veiga, Â.M. Moraes, G.A. Abraham, T.R. Cuadrado. "Dispersion and release of embelin from electrospun biodegradable, polymeric, membranes". *Polymer Journal*, 44 (11), 1105-1111, 2012. ISSN: 0032-3896.
doi: 10.1038/pj.2012.80
2. P.C. Caracciolo, **P.R. Cortez Tornello**, F. Montini Ballarin, G.A. Abraham. "Development of electrospun nanofibers for biomedical applications: State of the art in Latin America". *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 3 (1), 39-60, 2013. ISSN: 2157-9083.
doi: 10.1166/jbt.2013.1066
3. **P.R. Cortez Tornello**, P.C. Caracciolo, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham "Structural characterization of electrospun micro/nanofibrous scaffolds by liquid extrusion porosimetry: a comparison with other techniques". *Materials Science and Engineering Part C*, 41, 335-342, 2014. ISSN: 0928-4931.
doi: 10.1016/j.msec.2014.04.065
4. K.P. Seremeta, C. Höcht, C. Taira, **P.R. Cortez Tornello**, G.A. Abraham, A. Sosnik. Didanosine-loaded poly(epsilon-caprolactone) microparticles by a coaxial electrohydrodynamic atomization technique (CEHDA): Process optimization process and *in vitro* and *in vivo* performance. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014. ISSN 2050-750X.
doi: 10.1039/C4TB00664J

En Preparación:

5. **P.R. Cortez Tornello**, A. Tapia, G.E. Feresin, M. Dzieciuch, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham. "*In vitro* release behavior of embelin-loaded poly(ε-caprolactone) microparticles obtained by emulsion-freeze drying and electrohydrodynamic atomization techniques".
6. **P.R. Cortez Tornello**, A. Tapia, G.E. Feresin, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham. "Embelin-based electrospun matrices: From single scaffolds to multilayer scaffold structures".

Capítulos de Libros

1. F. Montini Ballarin, **P.R. Cortez Tornello**, G.A. Abraham. "Nanofibras Electrohiladas para Usos Terapéuticos" Módulo II: "Tecnologías aplicadas al diseño y producción de sistemas terapéuticos" en: *Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapéuticos avançados / Biomateriais*

Aplicados al Diseño de Sistemas Terapéuticos Avanzados (H. Souza, M. Braga, A. Sosnik, Editores). Coimbra University Press, Portugal. En Prensa. 2014.

2. **P.R. Cortez Tornello**, F. Montini Ballarin, P.C. Caracciolo, G.A. Abraham. "Micro/nanofiber-based structures for tissue engineering applications: potential and current challenges" en: *Applications of Nanobiomaterials MULTI VOLUME SET (I-XI), NanoBioMaterials in Soft Tissue Engineering*. Volume V. Grumenezcu A. (Editor). En Prensa. 2015.

Publicaciones en revistas de divulgación científica

1. P.C. Caracciolo, **P.R. Cortez Tornello**, F. Buffa, F. Montini Ballarin, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham. Pequeñas fibras, grandes aplicaciones. *Ciencia Hoy*, 21 (121), 57 – 64, 2011. ISSN: 0327-1218.

Participación en Congresos nacionales e internacionales

Congresos nacionales

1. *XVII Congreso Argentino de Bioingeniería SABI 2009 y VI Jornadas de Ingeniería Clínica*. Rosario, Santa Fé, Argentina. 14 – 16 de Octubre, 2009. **P. Cortez Tornello**, G. Feresin, A. Tapia, G.A. Abraham, T.R. Cuadrado. "Soportes microfibrosos de PCL para incrementar la biodisponibilidad de Embelina". Comunicación oral. O.75 p.26.
2. *XVII Simposio Nacional de Química Orgánica, XVII SINAQO*. 15 – 18 de noviembre, 2009. Mendoza, Argentina. **P. Cortez Tornello**, G.A. Abraham, G.E. Feresin, A. Tapia, T.R. Cuadrado. "Caracterización de un dispositivo biodegradable poroso de policaprolactona para suministro controlado de Embelina". Póster.
3. *III Encuentro Nacional de Materia Blanda*. 24–26 de noviembre, 2010. Mar del Plata, Argentina. **P.R. Cortez Tornello**, G.A. Abraham, T. R. Cuadrado. "Solubilización de principios bioactivos en matrices biocompatibles electrohiladas". Modalidad póster con presentación oral.
4. *III Encuentro Nacional de Materia Blanda*. 24 – 26 de noviembre, 2010. Mar del Plata, Argentina. **P.R. Cortez Tornello**, P.C. Caracciolo, F. Montini Ballarin, F. Buffa, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham. "Matrices nanofibrosas en el campo biomédico". Póster con presentación oral.
5. *I Congreso Argentino de Ingeniería, CADI 2012*. 8 – 10 de agosto, 2012. Mar del Plata, Argentina. **P.R. Cortez Tornello**, F. Montini Ballarin, M.A. González, D.S Comas, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham. "Obtención y caracterización de estructuras porosas para aplicaciones biomédicas". Publicado en CD.
6. *IV Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales, JIM*. 9 y 10 de octubre, 2012. Mar del Plata, Argentina. **P.R.**

- Cortez Tornello**, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham “Determinación de la porosidad en membranas micro/nanofibras electrohiladas”
7. *2º Curso Internacional de la “Red Iberoamericana de Nuevos Materiales para el Diseño de Sistemas Avanzados de Liberación de Fármacos en Enfermedades de Alto Impacto Socioeconómico (RIMADEL)” Simposio de Estudiantes.* 5 – 9 de noviembre, 2012. Buenos Aires, Argentina. **P.R. Cortez Tornello**, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham. “Estudio de la liberación de embelina dispersa en matrices nanofibras”. Exposición oral.
 8. *VII Encuentro Biólogos en Red.* 15 y 16 de noviembre 2012. Mar del Plata, Argentina. **P.R. Cortez Tornello**, F. Montini Ballarin, P.C. Caracciolo, G.A. Abraham. “Sistemas poliméricos nanoestructurados para aplicaciones biomédicas”. Exposición oral.
 9. *X Simposio Argentino de Polímeros, SAP 2013.* 28 – 30 de agosto, 2013. Buenos Aires, Argentina. **P. Cortez Tornello**, P.C. Caracciolo, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham. “Estudio de la morfología de matrices micro/nanofibras con alta porosidad”. Póster.
 10. *XIX Congreso Argentino de Bioingeniería, SABI 2013 y VIII Jornadas de Ingeniería Clínica.* 4 – 6 de septiembre, 2013. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. **P. Cortez Tornello**, G. Feresin, A. Tapia, G.A. Abraham, T.R. Cuadrado. “Cálculo de distribuciones de micro/nanopartículas utilizando transformada de Hough”. Presentación oral.
 11. *4to. Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional (4CAB2C) y 4ta. Conferencia Internacional de la Sociedad Iberoamericana de Bioinformática (SolBio).* 29 – 31 de octubre, 2013. Rosario, Argentina. **I.A. Pagnuco, P R Cortez Tornello, J I Pastore, M Brun, V Ballarin.** “*Detection and Measurement of Nanoparticles*”. Modalidad poster.

Congresos Internacionales

1. *2º Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, OBI 2011.* 28 – 30 de septiembre, 2011. Mar del Plata, Argentina. **P. Cortez Tornello**, G.E. Feresin, A. Tapia, G.A. Abraham. T.R. Cuadrado. “Microfibras bioresorbables poliméricas con matriz polimérica dispersa de agentes antifúngicos”. ISBN: 978-987-27301-0-9. Abstract in *Biocell* 36(1) A43 (2012).
2. *2nd International Symposium on Innovation and Technology - 2nd ISIT2011.* 28 – 30 de noviembre, 2011 Lima, Perú. **P.R. Cortez Tornello, J.I. Pastore,** D.S. Comas, A. Bouchet, G.A. Abraham, T.R. Cuadrado “Análisis estructural de poros en matrices poliméricas para ingeniería de tejidos utilizando Morfología Matemática y Reconstrucción 3D”.
3. *VII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais,* VII COLAOB. 22 – 25 de agosto, 2012. Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. **P.R. Cortez Tornello,** I.G. Veiga, Â.M. Moraes, **G.A. Abraham,** T.R. Cuadrado.

4. “Estudio de la liberación de embelina dispersa en matrices de poli(ϵ -caprolactona)”. Póster.
5. *3º Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos*, OBI 2013. 26 – 28 de septiembre, 2013. Viña del Mar, Chile. **P. Cortez Tornello**, G.E. Feresin, A. Tapia, G.A. Abraham. T.R. Cuadrado. “*In vitro* release studies of embelin-loaded PCL *electrospun* matrices”. Póster C15
6. *VIII Congreso Latinoamericano de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos* (VIII COLAOB). 20 – 23 de agosto, 2014. Rosario, Argentina. J.I. Igartúa Roselló, **P.R. Cortez Tornello**, G.A. Abraham, P.C. Caracciolo. “Development and characterization of electrospun scaffolds with enlarged pore size for tissue engineering applications”. Póster 2A-88.
7. *VIII Congreso Latinoamericano de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos* (VIII COLAOB). 20 – 23 de agosto, 2014. Rosario, Argentina. **P.R. Cortez Tornello**, A. Tapia, G.E. Feresin, M. Dzieciuch, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham. “In vitro release of embelin-loaded microparticles obtained by electrohydrodynamic atomization (EHDA)”. Trabajo premiado como mejor exposición oral. 3A-17