

# Hidrogeles termosensibles basados en quitosano para liberación dual de fármaco

O. Sánchez<sup>1,\*</sup>, C. Bello<sup>1,\*</sup>, N. Arranz<sup>1</sup>, A. Larrañaga<sup>1</sup>, A. Lejardi<sup>1</sup>, J.R. Sarasua<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Minero-Metalúrgica y Ciencia de los Materiales y POLYMAT, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

\* Ambos autores han contribuido equitativamente en el presente trabajo

## Resumen

*En el presente trabajo, se han desarrollado hidrogeles termosensibles nano-/microcompuestos basados en quitosano/poli(vinil alcohol) como sistemas poliméricos que permiten la liberación dual de fármacos solubles e insolubles en agua. Dicho sistema presenta una transición sol-gel cercana a la temperatura corporal (es decir, se comporta como un líquido inyectable por debajo de la temperatura corporal mientras que presenta una consistencia semisólida por encima de la misma) que, junto con su buena biocompatibilidad y no citotoxicidad, lo convierten en un sistema polimérico con amplio potencial en aplicaciones biomédicas. El agente terapéutico soluble en agua (es decir, Tianfenicol) es directamente incorporado durante la fabricación del gel mientras que el agente no soluble en agua (es decir, curcumina) es previamente encapsulado en nano-/micropartículas de poli(D,L-lactida) que son posteriormente incorporadas en la estructura tridimensional del hidrogel.*

## 1. Introducción

Los sistemas poliméricos para la liberación controlada de fármacos se basan en la incorporación de un activo terapéutico a una estructura polimérica y su consiguiente liberación en respuesta a un estímulo biológicamente relevante (p.ej., pH, temperatura, etc.), estímulo externo (p.ej., radiación infrarroja, ultrasonidos, etc.) o por difusión controlada al medio [1].

De particular interés para aplicaciones biomédicas son aquellos sistemas poliméricos que permiten la liberación dual de activos terapéuticos solubles e insolubles en agua. Entre ellos destacan los liposomas o su alternativa sintética, los polimersomas, que permiten incorporar simultáneamente fármacos solubles en agua en su interior y fármacos insolubles en agua en su membrana [2, 3].

Alternativamente, la fabricación de hidrogeles nano-/microcompuestos también permite el desarrollo de sistemas poliméricos para la liberación dual de fármacos. Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales hidrofílicas que contienen una gran cantidad de agua. Sus estructuras son porosas, lo cual permite la carga de fármacos solubles en agua durante su fabricación, para poder después liberarlos por difusión [4]. Es posible utilizarlos como sistemas de liberación dual, incorporando micelas o nano-/micropartículas poliméricas cargadas de fármacos insolubles en agua en su matriz tridimensional [5]. En el presente trabajo, se ha desarrollado un hidrogel nano-/microcompuesto basado en nano-/micropartículas de poli(D,L-lactida) (PDLLA) cargadas de curcumina (es

decir, insoluble en agua) que están embebidas en un hidrogel termosensible de base quitosano/poli(vinil alcohol) (CS/PVA) cargado con Tianfenicol (es decir, soluble en agua).

El quitosano (CS) consiste en un aminopolisacárido semicristalino que se obtiene mediante desacetilación de la quitina y está siendo ampliamente utilizado en ámbitos biomédicos y farmacéuticos [6]. Esto se debe a propiedades como la no toxicidad, biodegradabilidad, o la excelente biocompatibilidad, las cuales resultan muy favorables en el campo médico.

El PVA es un copolímero semicristalino de acetato de vinilo y alcohol de vinilo soluble en agua. Al igual que el quitosano, cuenta con propiedades muy adecuadas para aplicaciones biomédicas, destacando su buena biocompatibilidad y no toxicidad [7].

Una de las mayores ventajas que ofrecen estos hidrogeles de CS/PVA es que no es necesario el uso de agentes entrecruzantes para su fabricación, formándose la red tridimensional a través de interacciones físicas. Además son termosensibles, presentando una temperatura de transición sol-gel cercana a la temperatura corporal (es decir, 37°C) [8]. De este modo, a temperaturas menores a la corporal, se comporta como un líquido inyectable que se transforma en un hidrogel semisólido a temperatura corporal, lo cual lo hace muy útil en varias aplicaciones biomédicas, incluyendo la liberación de fármacos o la ingeniería de tejidos [9].

Por otro lado, la limitación de estos hidrogeles para transportar drogas hidrofóbicas, debida a la pobre solubilidad de la droga en la matriz del hidrogel, puede ser solventada mediante la encapsulación del fármaco en partículas formadas a partir de polímeros sintéticos biodegradables [8] y posterior incorporación de las mismas en el sistema. Aquí se han utilizado nano- y micropartículas poliméricas de PDLLA, que es un polímero ampliamente utilizado en diversas aplicaciones biomédicas (p.ej., suturas, matrices de anclaje tridimensional, elementos de fijación, etc.) y está aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*), para incorporar un fármaco no soluble en agua (es decir, curcumina) en el hidrogel arriba mencionado. Tras una extensa caracterización morfológica de las nano-/micropartículas y los hidrogeles nano-/microcompuestos mediante microscopía electrónica de barrido y dispersión

dinámica de luz, se estudió la liberación dual de curcumina y Tianfenicol de dichos sistemas.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Materiales

La poli(D,L-lactida) (PDLLA,  $M_w=75000$ ) fue adquirida de Purac, mientras que el poli(vinil alcohol) (PVA,  $M_w=13000-23000$ ), la poli(D-glucosamina) (quitosano, CS, bajo peso molecular), el bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ), el tampón fosfato salino (PBS), el Tianfenicol ( $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{NO}_5\text{S}$ ,  $M_w=356.22$ ) y la curcumina ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ ,  $M_w=368.38$ ,  $\geq 80\%$  curcumina) fueron suministrados por Sigma Aldrich, al igual que el ácido clorhídrico (HCl). El resto de los disolventes como el acetato de etilo extra puro, el metanol (MetOH, 99,8%), el etanol (EtOH, 96%) y el cloroformo fueron adquiridos en LabKem. Finalmente, el agua destilada desionizada fue suministrada por Iberia Agua.

### 2.2. Fabricación de partículas

La fabricación de nano-/micropartículas de PDLLA se llevó a cabo mediante el proceso de emulsión simple aceite en agua. En primer lugar, se disolvieron durante 1 hora en agitación magnética 45 mg de PDLLA y 5 mg de curcumina en 2,5 ml de acetato de etilo, para obtener la fase aceitosa. Tras ello, la fase aceitosa se añadió gota a gota sobre la fase acuosa (10 ml de PVA 1%) bajo agitación magnética. La emulsión formada se mantuvo en agitación durante 1 hora. A continuación, se homogeneizó la emulsión usando un homogeneizador a 25000 rpm (UltraTurrax) para la fabricación de micropartículas o un sonicador para la fabricación de nanopartículas durante 3 minutos en baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de la emulsión. Finalmente, la emulsión se vertió en 27,5 ml de agua destilada manteniéndola en agitación durante toda la noche a 500 rpm, para asegurar la completa evaporación del acetato de etilo. Finalmente, se recolectaron las micro-/nanopartículas mediante centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos y se lavaron extensamente con agua destilada antes de secarse en cámara de vacío a temperatura ambiente durante toda la noche.

### 2.3. Fabricación de hidrogeles cargados de partículas

Para llevar a cabo la fabricación del hidrogel cargado de nano-/micropartículas de PDLLA, se preparó una disolución de 3 ml de 0,5% PVA a 4°C, a la que se añadieron 0,6 ml de  $\text{NaHCO}_3$  (1M) bajo agitación magnética. De esta disolución se extrajo 1 ml que se utilizó para resuspender 66 mg de nano-/micropartículas de PDLLA. Tras garantizar una completa redispersión de las partículas mediante sonicación, dichas partículas se devolvieron a la disolución de PVA. A continuación, dicha dispersión se añadió gota a gota a 3 ml de 2% CS en 0,1M HCl, manteniendo la temperatura de 4°C. Finalmente se añadieron 30 mg de Tianfenicol y, una vez asegurada su completa disolución, se repartió la mezcla en tres moldes de 1,5 ml cada uno, para introducirlo en el horno a 37°C durante 2 h y formar así el hidrogel (Figura 1).

### 2.4. Caracterización de partículas

Para realizar la caracterización morfológica de las nano- y micro partículas de PDLLA se usó el microscopio electrónico de barrido (SEM, Hitachi S-3400 N), operando a 10.0 kV. En el caso de las nanopartículas, también se utilizó la dispersión dinámica de luz (DLS, Malvern Nano ZS90) con el fin de estimar la distribución de tamaños obtenida.

Para conocer la Eficiencia de Encapsulación (E.E.) y la Capacidad de Carga (L.C.) de las partículas, éstas se disolvieron en una solución de cloroformo:metanol 1:10. Tras su completa disolución, se determinó la concentración de curcumina en la disolución mediante espectroscopía UV (Perkin Elmer, Lambda 265) con la ayuda de una recta de calibrado previamente preparada con disoluciones de concentración conocidas en el rango de 0-20 ppm. Las medidas de absorbancia se tomaron a 425 nm.

$$E.E. = \frac{\text{Masa curcumina}}{\text{Masa curcumina teórica}} \times 100$$

$$L.C. = \frac{\text{masa curcumina}}{\text{masa curcumina} + \text{masa polímero}} \times 100$$

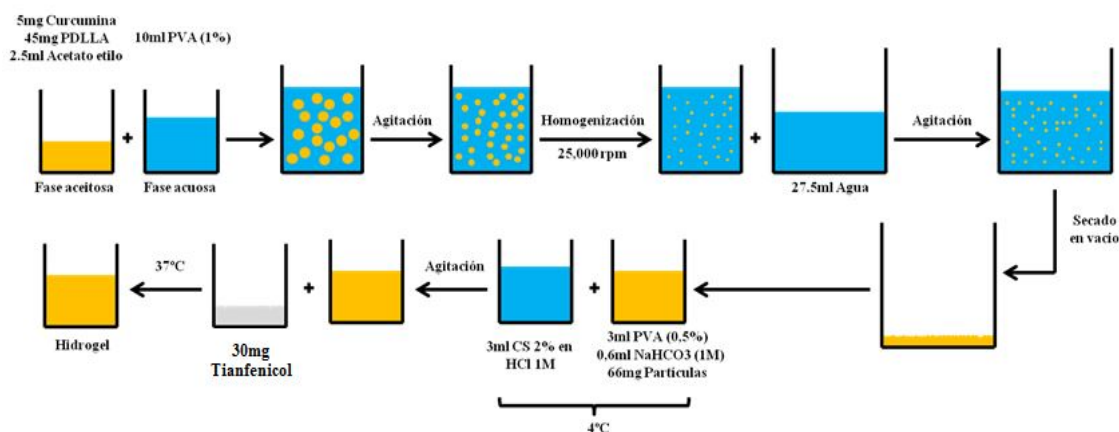


Figura 1. Proceso de fabricación del hidrogel con los fármacos

El ensayo de degradación hidrolítica de las nano-/micropartículas de PDLLA se llevó a cabo durante 1 mes. Para ello se fabricaron nano-/micropartículas de PDLLA con y sin curcumina, que se resuspendieron en PBS y se mantuvieron bajo agitación y a 37°C. Cada 7 días, se extrajo una muestra y, tras su secado, se determinó su peso molecular y su polidispersidad mediante cromatografía de permeación en gel (GPC, Waters 1515).

### 2.5. Caracterización de hidrogeles

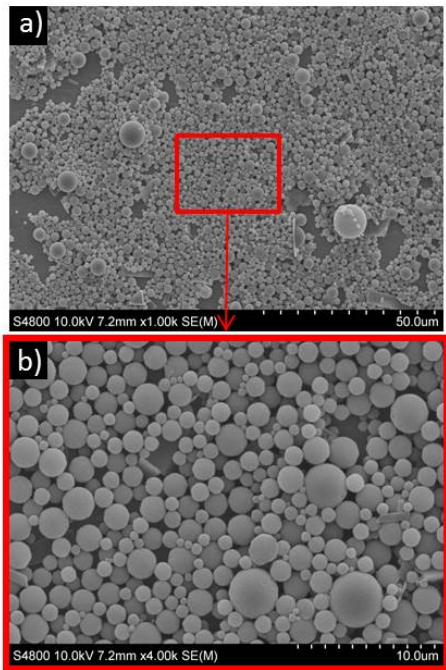
Para realizar la caracterización morfológica de los hidrogeles cargados con nano-/micropartículas de PDLLA, el hidrogel formado se liofilizó y se observó mediante SEM.

Para realizar la medición de los fármacos liberados, inicialmente se preparó una curva de calibrado en PBS-etanol (50:50) mediante espectroscopía UV para cada uno de ellos, a unas longitudes de onda ( $\lambda$ ) de 225 nm para el Tianfenicol (rango 0-20 ppm), y de 425 nm para la curcumina (rango 0-20 ppm). Posteriormente, las muestras se sumergieron en una solución de PBS-etanol (50:50) a 37°C y se extrajeron muestras de forma regular para determinar la liberación de los fármacos.

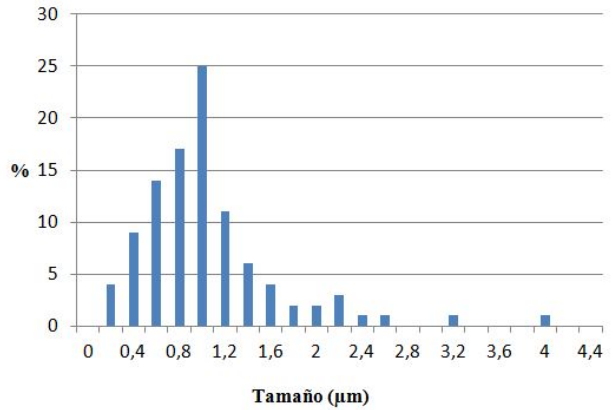
## 3. Resultados

### 3.1. Caracterización de partículas

La figura 2 muestra una micrografía SEM de las micropartículas de PDLLA cargadas con curcumina obtenidas mediante la emulsión simple aceite en agua. Las partículas presentan un tamaño medio de  $1,14 \pm 0,66 \mu\text{m}$  y su distribución se muestra en la figura 3.



**Figura 2.** Microscopía SEM de micropartículas de PDLLA y curcumina a)1000 aumentos y b)4000 aumentos



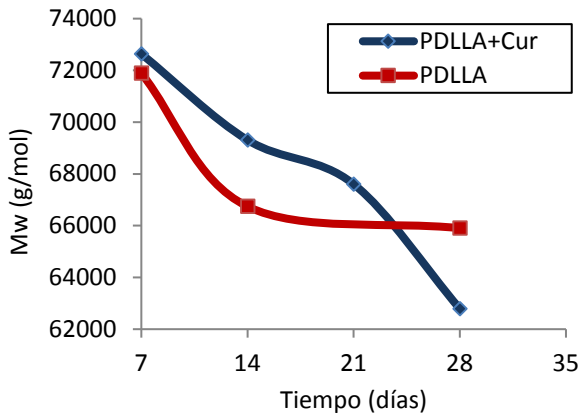
**Figura 3.** Histograma de la distribución de tamaño de partículas

Las micropartículas muestran una capacidad de carga de 5,55% y una eficiencia de encapsulación del 55,52% (Tabla 1).

	L.C. (%)	E.E. (%)
Micropartículas PDLLA	5,55	55,52

**Tabla 1.** Datos de L.C. y E.E.

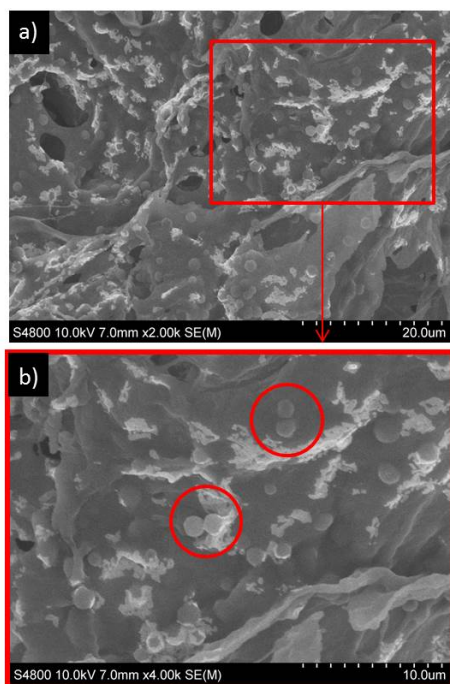
Tal y como se puede observar en la Figura 4, las micropartículas de PDLLA apenas sufren degradación hidrolítica tras haber sido sumergidas en PBS a 37°C durante un mes. De este modo, el peso molecular de las micropartículas desciende ligeramente desde su valor inicial ( $\sim 72 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ ) a un valor de  $\sim 64 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  tras un mes.



**Figura 4.** Degradación hidrolítica de partículas de PDLLA y partículas de PDLLA cargadas con curcumina

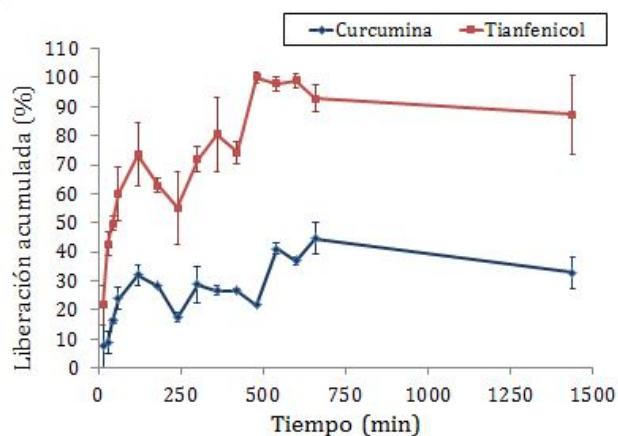
### 3.2. Caracterización de hidrogeles

La Figura 5 muestra la estructura del hidrogel tras ser liofilizado. Como se puede observar, se trata de una estructura altamente porosa en la que se pueden observar embebidas y bien distribuidas (destacadas en rojo) las micropartículas de PDLLA cargadas con curcumina.



**Figura 5.** SEM de hidrogel con micropartículas de PDLLA a)2000 aumentos b)4000 aumentos con micropartículas señaladas en rojo

La Figura 6 muestra los perfiles de liberación de la curcumina y el Tianfenicol durante 24 h. Como se puede observar, el Tianfenicol es liberado completamente tras 10 h, indicando una rápida liberación que puede ser asociada a su baja interacción con el hidrogel y a su buena solubilidad en agua. Por el contrario, sólo el ~30% de la curcumina fue liberada tras 24 h.



**Figura 6.** Liberación dual de ambas drogas del sistema.

#### 4. Conclusiones y trabajos futuros

En el presente trabajo se han preparado hidrogeles termosensibles basados en quitosano que permiten la liberación simultánea de fármacos solubles e insolubles en agua gracias a la incorporación de nano-/micropartículas poliméricas de PDLLA en su estructura. Gracias a su inyectabilidad y su biocompatibilidad, estos hidrogeles presentan un amplio potencial en aplicaciones biomédicas para la liberación dual de fármacos. El fármaco soluble en agua es directamente incorporado en

la estructura del hidrogel durante su fabricación, lo que resulta en una rápida liberación debido a su buena solubilidad y baja interacción con la matriz. Por el contrario, para la completa liberación del fármaco no soluble en agua, es necesaria la progresiva degradación de las nano-/micropartículas poliméricas. Considerando la lenta degradación hidrolítica de las partículas de PDLLA estudiadas aquí, se están llevando a cabo actualmente estudios con poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA). Se espera que, debido a la más rápida degradación de las nano-/micropartículas de PLGA, la liberación de la curcumina ocurra de manera más rápida. Además, se están realizando estudios con nanopartículas. De este modo, se podrán establecer aquellos parámetros (es decir, tamaño de partículas, degradabilidad de las nano-/micropartículas) que determinan la liberación del fármaco no soluble en agua. Esto nos permitirá diseñar sistemas de liberación dual en los que la liberación de los fármacos pueda ser ajustada a la necesidad biomédica concreta.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de los servicios generales de investigación de la UPV/EHU (SGIker) por su soporte con las medidas de SEM.

#### Referencias

- [1] Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol 62, 2010, pp 83-99.
- [2] Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, vol 303(5665), 2014, pp 1818-22.
- [3] Discher B, Won Y, Ege D, Lee J, Bates F, Discher D, Hammer D. Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. *Science*, vol 284 (5417), 1999, pp 1143-1146.
- [4] Hoare T, Kohane D. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, vol 49, 2008, pp 1993-2007.
- [5] Wei L, Cai C, Lin J, Chen T. Dual-drug delivery system based on hydrogel/micelle composites. *Biomaterials*, vol 30, 2009, pp 2606-2613.
- [6] Li X, Chen S, Zhang B, Li M, Diao K, Zhang Z, Li J, Xu y, Wang X, Chen H. *In situ* injectable nano-composite hydrogel composed of curcumin, N-O-carboxymethyl chitosan and oxidized alginate for wound healing application. *International Journal of Pharmaceutics*, vol 437, 2012, pp 110-119.
- [7] Sung J, Hwang M, Kim J, Lee J, Kim Y, Kim J, Chang S, Jin S, Kim J, Lyoo W, Han S, Ku S, Yong C, Choi H. Gel characterization and *in vivo* evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, vol 392, 2010, pp 232-240.
- [8] McKenzie M, Betts D, Suh A, Bui K, Kim L, Cho H. Hydrogel-based drug delivery systems for poorly water-soluble drugs. *Molecules*, vol 20, 2015, pp 20397-20408.
- [9] Tang Y, Du Y, Hu X, Shi X, Kennedy J. Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) blend hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, vol 67, 2007, pp 491-4