

Degradación de ácido poliláctico/hidroxiapatita y ácido poliglicólico en fluido corporal simulado

Degradation of polylactic acid / hydroxyapatite and polyglycolic acid in simulated body fluid

HUGO A. ESTUPIÑÁN

*Ingeniero Metalúrgico con Maestría en Ingenierías. Doctor en Ingeniería Química
Escuela de Ingeniería de Materiales. Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia
haestupinand@unal.edu.co*

CUSTODIO VÁSQUEZ

*Ingeniero Metalúrgico con Maestría en Ingenierías
GIC. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia
custodio@uis.edu.co*

DARÍO Y. PEÑA

*Ingeniero Metalúrgico UIS. Magister en Ingeniería Metalúrgica. Ph.D en Corrosión
GIC. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia
dypena@uis.edu.co*

LUISA FERNANDA ARDILA

*Ingeniera Química y Magister en Ingeniería de Materiales.
GIC. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia
luisfardila@gmail.com*

Fecha recibido: 16/09/2011

Fecha de aprobación: 15/12/2011

RESUMEN

El presente trabajo de investigación presenta la degradación de materiales compuestos de ácido poliláctico, ácido poliglicólico e hidroxiapatita en un electrolito de solución fisiológica simulada, fue evaluada mediante electroquímica y microbalanza de cristal de cuarzo. Los materiales fueron obtenidos a diferentes concentraciones y electrodepositados catódicamente sobre cristales de cuarzo piezoeléctricos para formar películas delgadas. Los cristales recubiertos fueron sumergidos durante 1, 3, 5, 7 y 10 días en fluido corporal simulado a temperatura y pH constantes y en cada intervalo se realizaron análisis de espectroscopia de impedancia electroquímica y microbalanza de cristal de cuarzo que permitieron relacionar los cambios de frecuencia de la microbalanza con la carga eléctrica total transferida durante el proceso de degradación.

PALABRAS CLAVE: biomateriales, impedancia, microbalanza, degradación hidrolítica.

ABSTRACT

In this work the degradation of composites of polylactic acid, polyglycolic acid and hydroxyapatite in a simulated physiological electrolyte solution was evaluated by electrochemical quartz crystal microbalance. The materials were obtained at different concentrations and cathodically electrodeposited on piezoelectric quartz crystals to form thin films. Coated crystals were immersed for 1, 3, 5, 7 and 10 days in simulated body fluid at temperature and pH constant at each interval analysis was performed Electrochemical Impedance Spectroscopy and Quartz Crystal Microbalance that allowed to relate the frequency change of the microbalance with the total electric charge transferred in the process of degradation.

KEYWORDS: biomaterial, impedance, microbalance, hydrolytic degradation.

1. INTRODUCCIÓN

La revolución en la biología celular molecular, en combinación con los avances de la ciencia y la ingeniería de polímeros, está impulsando el campo de los biomateriales hacia nuevas aplicaciones y hacia una era de diseño molecular. Nuevos biopolímeros degradables e hidrogeles funcionalizados, han sido desarrollados para formar ligandos moleculares con grupos celulares específicos. Actualmente existen polímeros sintéticos bioabsorbibles utilizados en el campo biomédico, los cuales tienen la capacidad de degradarse, debido a reacciones de hidrólisis en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo humano, después de cierto tiempo de ser implantados dan lugar a productos que no son tóxicos y que pueden ser eliminados por el organismo o metabolizados por éste [1].

Éstos polímeros son materiales atractivos para la elaboración de soportes en ingeniería de tejidos porque ofrecen la posibilidad de crear tejidos completamente naturales dejando de lado los problemas de infección y formación de tejido fibroso, asociados a los implantes permanentes [2].

Algunos de los materiales empleados con más frecuencia en aplicaciones biomédicas son los biopolímeros como el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA). El primero, es un polímero sintético termoplástico de la familia de los poliésteres alifáticos basado en ácido láctico que como biomaterial ha demostrado su capacidad de permitir el crecimiento controlado del tejido biológico durante su biodegradación. El PLA puede hidrolizarse fácilmente a ácido láctico, mediante un proceso de degradación hidrolítica, lo cual podría suministrar algunas ventajas en su reciclaje, a su vez es biocompatible (no provoca rechazo), biodegradable (se elimina naturalmente), inmunológicamente inerte (no produce alergias), no tóxico y reabsorbible (con reabsorción completa) [3]. El segundo, es un poliéster lineal biodegradable de estructura muy simple. Las fibras obtenidas a partir de éste se caracterizan por su alta fuerza y módulo de Young, pero son demasiado rígidas para ser usadas como suturas, excepto si se usan en forma de material trenzado. Puede emplearse como dispositivo de fijación ósea en forma de varillas, planchas o tornillos, y como implante para sustituir fragmentos óseos o como sistema de liberación de medicamentos.

Adicional a los biopolímeros, dentro de los biomateriales también se han estudiado las cerámicas biocompatibles, entre las cuales se encuentran diferentes

tipos de fosfatos cálcicos (CaP): hidroxiapatita, fosfato tricálcico, hidroxiapatita carbonatada, apatita pirofosfato, fosfato tetracálcico, etc. La ventaja de este tipo de materiales es que se unen directamente al hueso sin ningún tipo de tejido fibroso en la interfaz, es decir, presentan una alta bioactividad. Entre estos fosfatos cálcicos, la composición química está muy cercana a la del fosfato cálcico del hueso. Actualmente está muy bien documentado el hecho de que el hueso desarrolla una unión fuerte con implantes hechos de hidroxiapatita (HAP) sinterizada, es decir que presenta una elevada bioactividad [4].

Finalmente y teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos, un material por sí solo no puede cubrir todos los requerimientos de propiedades mecánicas, biocompatibilidad, etc., en las últimas décadas se han unido esfuerzos al estudio de materiales compuestos, los cuales son aquellos que están formados por combinaciones de metales, cerámicos y polímeros. Las propiedades que se obtienen de estas combinaciones son superiores a la de los materiales individuales. Las propiedades que se obtienen son un producto de la combinación de los refuerzos que se utilicen y de la matriz que soporta al refuerzo en los materiales compuestos [5].

En esta investigación por el mecanismo de electrodeposición catódica, se obtuvieron películas de PLA/HAP y PGA/HAP inmovilizadas electroquímicamente en cristales de cuarzo Au-Cr para su posterior caracterización y el análisis de la degradación del biomaterial, para esto se empleó la combinación entre Microbalanza de Cristal de Cuarzo (*QCM*) y Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (*EIS*). Dicha combinación además de proveer información, acerca del proceso de degradación del polímero, puede mostrar información sobre la variación de la masa, el hinchamiento, la delaminación, la viscoelasticidad y la formación de poro [6-13].

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1 Obtención de Recubrimientos

Los materiales empleados para los recubrimientos fueron PLA, PGA y HAP obtenidos de la síntesis del Ácido L-láctico mediante policondensación, de la síntesis de Ácido Glicólico mediante condensación y mediante precipitación acuosa de Fosfato de Amonio y Nitrato de Calcio Tetra Hidratado, respectivamente. Dichos materiales fueron debidamente caracterizados y se emplearon en forma de películas delgadas

electrodepositadas catódicamente sobre cristales de cuarzo piezoeléctricos, empleando un electrolito de material compuesto/acetona al 15%, a un tiempo de 9 minutos y un voltaje de 9 V que fueron definidos en ensayos preliminares.

Posteriormente los cristales recubiertos fueron sumergidos durante 1, 3, 5, 7 y 10 días en fluido corporal simulado (*SBF*) a temperatura y pH constantes, respectivamente; en cada intervalo se realizaron análisis de *EIS* y *QCM* empleando un potenciostato y una microbalanza de cristal de cuarzo, respectivamente. En la figura 1 se observan micrografías de las películas de polímero electrode depositadas sobre el cristal de cuarzo. En la figura 1(b) se observa la presencia de irregularidades (círculos rojos), probablemente producidas por el atrapamiento de aire en la interfase de la película de polímero y el cristal.



Figura 1. Micrografía de una película de PLA/HAP tomada a 5X. (a) Cristal de cuarzo sin recubrimiento, (b) cristal de cuarzo con recubrimiento.

2.2 Pruebas de Caracterización

Para el proceso de degradación de los materiales se empleó *SBF* como electrolito, el cual es una solución salina amortiguada por fosfatos y es comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución se preparó a partir de cloruro de sodio y fosfato de sodio. Su composición fue la siguiente: 8.6 g de NaCl , 0.22 g de KCl , 2.444 g de NaH_2PO_4 , 0.374 g de KH_2PO_4 , aforado con agua destilada hasta un litro y un pH de 7.4 [7].

Se realizó la evaluación de las propiedades electroquímicas (resistencia de la solución electrolítica, resistencia a la polarización e impedancia de transferencia de carga, en función de la frecuencia) del sustrato formado, en el ambiente biológico simulado. Esta evaluación se realizó utilizando *EIS*, para el estudio tanto de la corriente como de la impedancia de transferencia de carga del sistema estudiado.

Las pruebas de *EIS* se realizaron utilizando un potenciostato marca Gamry, disponiendo de una celda plana vertical con su respectivo cristal recubierto, el cual fue ubicado dentro de una celda de la *QCM*, y luego fue llenado con *SBF*. El contra-electrodo fue grafito y el electrodo de referencia Ag-AgCl . Todas las pruebas se realizaron manteniendo el pH en 7.4 y la temperatura en 25°C . Trabajos posteriores permitieron emplear otras temperaturas, como la temperatura corporal. Los ensayos de *EIS* se realizaron a una amplitud de voltaje de 10 mV y un barrido de frecuencia desde 0,01 Hz hasta 100.000 Hz. En la figura 2, se muestra el montaje realizado para la caracterización electroquímica y las pruebas simultáneas de *QCM*. Estas últimas permitieron obtener las pérdidas de masa. La relación entre los cambios en masa por unidad de área (Δm) y la frecuencia (Δf) es dada por la ecuación Sauerbrey [8]:

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m n f_0^2}{A \sqrt{\mu_c \rho_c}} \quad (1)$$

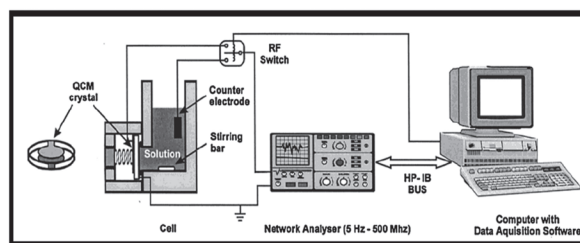


Figura 2. Montaje Celda - Equipos para realizar las pruebas electroquímicas.

El proceso de degradación de las películas inmovilizadas en los cristales de cuarzo se realizó durante 10 días consecutivos. Para cada día se realizaron tres mediciones electroquímicas y de pérdida de masa, simultáneamente. La figura 3 muestra las micrografías las películas de PLA degradadas, observándose en la figura 3b, marcas de erosión (grietas superficiales) producidas por la degradación hidrolítica en el fluido corporal.

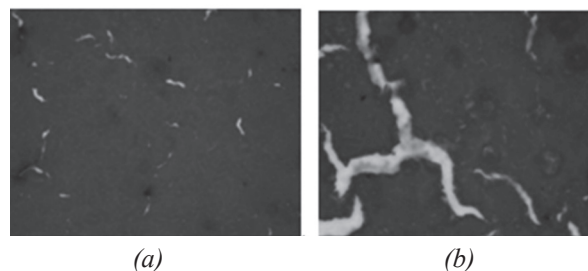


Figura 3. Micrografía de una película de PLA/HAP degradada. a) 5X, y b) 20X respectivamente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos de degradación se realizaron en 3 combinaciones de materiales, depositadas en cristales piezoeléctricos, Cada uno de los ensayos se realizó por duplicado, en un intervalo de 3 horas, 3 veces cada día. Los espectros de impedancia mostrados a continuación son los resultados obtenidos en la tercera corrida de cada día para los cristales con un porcentaje de polímero/cerámico 90/10, porque su comportamiento es muy similar para los demás porcentajes polímero/cerámico estudiados (95/5 y 85/15).

En la figura 4 se muestra el modelo obtenido en la simulación por circuitos equivalentes, que representa comportamiento electroquímico de los sistemas PLA/HAP y PGA/HAP. El elemento de fase constante (CPE3) y la resistencia de la doble capa (R4) se encuentran relacionados con el efecto de la HAP en el recubrimiento; el elemento de fase constante (CPE2) y la resistencia de la doble capa (R3) corresponden al sustrato (metal del cristal Au-Cr); la capacitancia (C1) y la resistencias R2 corresponden a la polarización del recubrimiento y la resistencia R1 al efecto del electrolito.

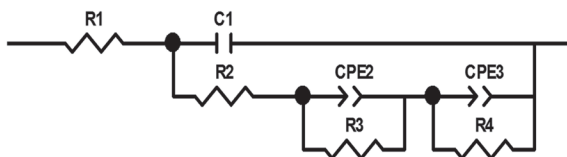
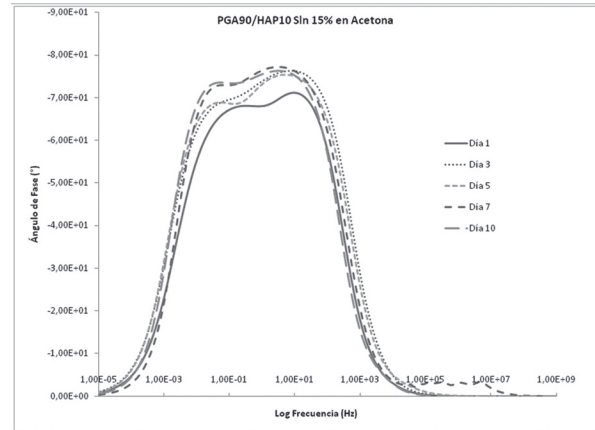
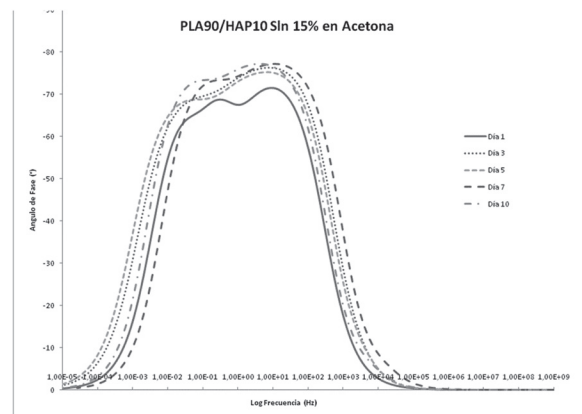


Figura 4. Circuito equivalente propuesto para los sistemas PLA/HAP y PGA/HAP obtenidos por electrodeposición catódica.

En los espectros de ángulo de fase vs logaritmo de la frecuencia (figura 5), simulados para los datos obtenidos en las pruebas electroquímicas, se observa una tendencia similar de las curvas para los dos materiales estudiados, evidenciándose un comportamiento de muy baja conductividad en el recubrimiento, con una capacitancia, entre 0,1 y 10 Hz, ángulos de fase alta ($>60^\circ$), y una inestabilidad en el diagrama a 1Hz, debido probablemente a la presencia de la cerámica bioactiva.



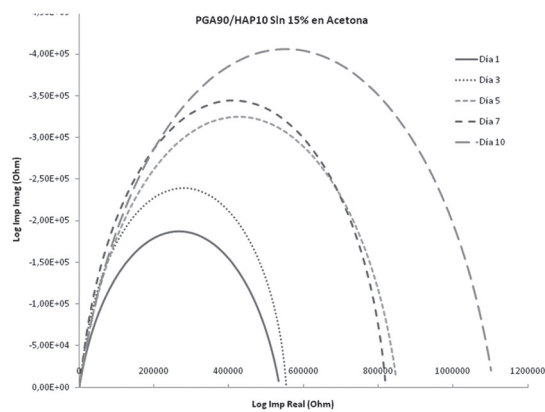
(a)



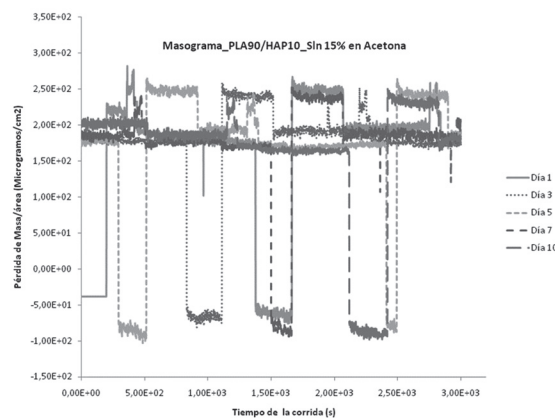
(b)

Figura 5. Diagramas de Ángulo de fase vs Logaritmo de la frecuencia. a) PGA/HAP (90/10%), b) PLA/HAP (90/10%).

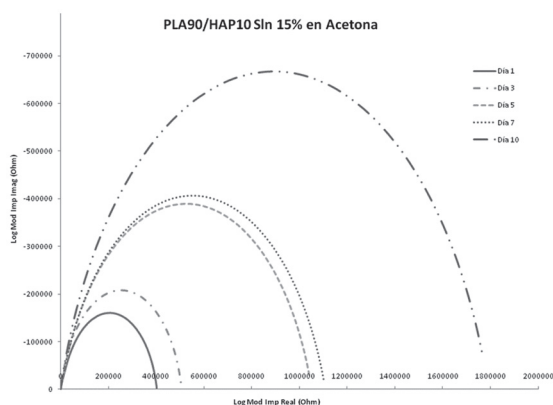
En los espectros de Nyquist (figura 6) de cada recubrimiento de material compuesto, se observa que al aumentar los días del ensayo de degradación, se produce un aumento del módulo de impedancia que puede atribuirse al hinchamiento del recubrimiento al absorber medio electrolito. La corriente que pasa a través de la interfase recubrimiento/electrolito, es conducida por los iones en solución. El efecto resistivo en la migración de los iones es representado por la resistencia del recubrimiento, la cual aumenta a medida que aumentan los días del ensayo, teniendo valores más bajos de resistencia con menos tiempo de degradación en los recubrimientos a base de ácido poliglicólico, que los de poliláctico.



(a)



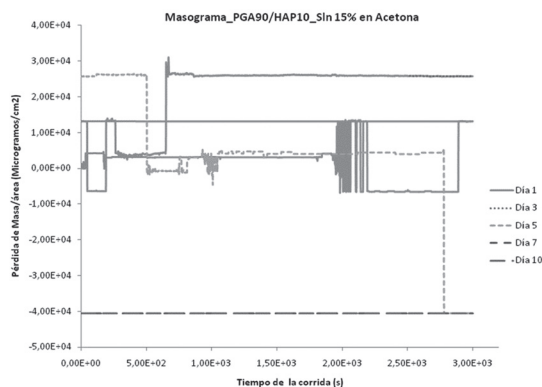
(b)



(b)

Figura 6. Diagramas de Nyquist. a) PGA/HAP (90/10%), b) PLA/HAP (90/10%).

El análisis de los datos obtenidos de pérdida de masa en el tiempo (figura 7) mostraron una diferencia notoria en los recubrimientos de PGA, comparados con los de PLA, lo cual corrobora las discrepancias encontradas en los valores de los elementos del circuito equivalente obtenidos en la simulación de los datos de los ensayos electroquímicos.



(a)

Figura 7. Masogramas a) PGA/HAP (90/10%), b) PLA/HAP (90/10%).

En ambos recubrimientos se presentó una variación apreciable de frecuencia-masa durante los 5 primeros días, con un traslape de las mediciones que nuevamente se repite para los días 7 y 10, en los cuales la pérdida fue mucho más representativa, mostrando una aparente degradación e hinchamiento generalizado del recubrimiento. En los masogramas del recubrimiento de PGA/HAP (90/10%) las variaciones de masa fueron mucho más significativas desde el primer día. Las heterogeneidades en los masogramas se deben a hinchamientos y deterioros localizados, causada por la degradación de la fase cristalina por la penetración del fluido y posterior destrucción localizada de la fase amorfa de la película de polímero. Se observa que este efecto es evidente tanto en la mezcla de PGA/HAP, como en la de PLA/HAP, pero mayor en la primera mezcla.

4. CONCLUSIONES

Los materiales compuestos de ácido poliláctico-hidroxiapatita y ácido poliglicólico-hidroxiapatita mostraron una clara transición de un comportamiento capacitivo en el fluido corporal simulado a un comportamiento resistivo, debido a la degradación y formación de poros en la superficie de polímero. Este comportamiento fue corroborado en los masogramas obtenidos.

La disminución en la resistencia a la transferencia de carga medida en la interfase polímero-cristal, representando los procesos del *bulk* del material, mostraron fenómenos alternados de hinchamiento y degradación, lo cual fue corroborado en los masogramas, al incrementar la masa asociada a la absorción de agua

dentro del polímero, con la simultánea disminución de la resistencia.

Se presentaron menores pérdidas de masa en los recubrimientos de PLA/HAP, comparados con los de PGA/HAP.

Según el ajuste al modelo de circuitos equivalentes obtenido, la presencia de una relajación de la transferencia de carga asociada a los procesos de adsorción sobre la superficie, corresponde a la interacción productos del intercambio iónico de los iones calcio y fosfato del fluido fisiológico simulado y la hidroxiapatita constituyente del material compuesto.

5. REFERENCIAS

- [1] Conde A., De Damborenea J.J, “Electrochemical impedance spectroscopy for studying the degradation of enamel coatings”, *Corr. Sci.*, vol. 44, September. 2001, pp. 155-1567.
- [2] Alvarez, N., Mantilla, J. Evolución de la cristalinidad de copolímeros de PLGA (70:30 y 50:50) mezclados con hidroxiapatita al 5% y al 10%, sometidos a degradación hidrolítica en fluido fisiológico simulado a 37°C, Tesis pregrado, UIS, Bucaramanga, 2009.
- [3] Rodriguez, Daniel. Obtención de capas de nitruro de titanio mediante tratamiento termoquímico en titanio y Ti6Al4V y caracterización de sus propiedades para aplicaciones biomédicas, Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, 2001.
- [4] Ginebra, Maria Pau. Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfatos tricálcico- α para aplicaciones quirúrgicas, Tesis Doctoral–Especialidad Física, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, 1996.
- [5] González, R. J. et al., “Caracterización mediante FTIR y DSC de la interacción Colágeno–Hidroxiapatita”, *IFMBE Proceedings* 2008, vol. 18, part 20, pp 1246-1249.
- [6] Sabot, Andrea; Krause, Steffi, “Simultaneous quartz crystal microbalance impedance and electrochemical impedance measurements. Investigation into the degradation of thin polymer films”, *Anal. Chem.*, vol. 74, No. 14, July 2002, pp. 3304-3311.
- [7] Rámila A.; Del Real R.P; Marcos R.; Horcajada P.; y Vallet-Regí M., “Drug release and in vitro assays of bioactive polymers/glass mixtures”, *J. Sol-Gel Sci. Tech.*, vol. 26, No. 1-3, 2003, pp 1195-1198.
- [8] Santos, Flavio; Méndez, Renata; Tatsuo, Lauro, “Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of biosensors”, *Quim. Nova*, vol. 27, No. 6, December 2004, pp. 970-979.
- [9] Sinha Ray Suprakas y Bousmina Mosto. Biodegradable polymers and they layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. *Progress in Materials Science*, 50 2005, p.p. 962-1079.
- [10] Bonzani, Ian C.; Geroje, Julian H., and STEVENS, Molly M. Novel materials for bone and cartilage regeneration. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 2006, pp. 568-575.
- [11] Zuwei, Ma; Zhengwei Mao y Changyou Gao. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60, 2007, pp. 137-157.
- [12] Schuler, Martin, Trentin, Diana, Textor, Marcus and Tosatti, Samuele. Biomedical Interfaces: titanium surface technology for implants and cell carriers. *Future Medicine, Nanomedicine*, 1, 4, 2006, pp. 449-463.
- [13] Lee, Jae Y., Bashur, Chris A., Goldstein, Aaron S. and Schimdt, Christine E. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials* 30, 2009, pp. 4325-4335.