

Soportes porosos 3D para regeneración ósea: liberación de un fármaco antiosteoporótico y un antiinflamatorio

Juan Luis Paris Fernández de la Puente

Licenciatura en Farmacia. UCM
juanluisparis@hotmail.com

María Victoria Cabañas Criado. Jesús Román Zaragoza.

Facultad de Farmacia. UCM
vicky@farm.ucm.es jeromzar@farm.ucm.es

Resumen: Se han sintetizado y caracterizado materiales compuestos porosos útiles en regeneración ósea. Los materiales sintetizados están constituidos por un componente inorgánico, nanohidroxycarbonatoapatita, similar a la fase mineral del hueso humano, y un componente orgánico, el polisacárido agarosa. Los soportes se han obtenido en condiciones próximas a temperatura ambiente lo que permite la introducción de biomoléculas durante el proceso de síntesis. En nuestro caso, se han añadido ibuprofeno (un antiinflamatorio) y ácido zoledrónico (un antiosteoporótico) y se ha realizado el estudio de liberación in vitro de ambos fármacos. El hecho de que el material se comporte como un hidrogel ha permitido, además, la introducción de estas sustancias activas por simple impregnación. Los estudios de liberación in vitro de las biomoléculas se han llevado a cabo en condiciones similares a las fisiológicas: en una solución salina al 0,9% y 37°C. Con objeto de estudiar la influencia del pH en la liberación se han realizado estudios a pH=7,4 y a pH=6,5. Con el fin de cuantificar la cantidad de fármaco liberada en función del tiempo y, dado que ambas sustancias se liberan simultáneamente al medio, se ha realizado la separación de los fármacos mediante un sistema cromatográfico de HPLC acoplado a un espectrofotómetro Ultravioleta-visible.

Palabras clave: Biomateriales. Liberación. Regeneración ósea. HPLC.

INTRODUCCIÓN

Los materiales compuestos cerámica/polímero son de gran interés en campos como los biomateriales implantables así como en ingeniería de tejidos. Entre ellos, cobran especial interés los materiales compuestos capaces de retener y liberar moléculas bioactivas que puedan aportar una mejora del comportamiento del material en la aplicación para la que están destinados.

En este trabajo se ha llevado a cabo la preparación y caracterización de un material biocompatible y bioabsorbible de estas características, sintetizado en forma de *andamio o soporte*, una pieza con poros tridimensionales interconectados que permitirían, en caso de ser implantados, una mayor vascularización del material.

Estudios previos realizados en el sistema Hidroxiapatita/polímero conteniendo una proteína modelo, seroalbúmina bovina (BSA) (Jornadas Complutense 2010, "Factores que afectan a la liberación de seroalbúmina bovina en sustitutivos óseos porosos"), permitieron conocer cómo modificar la velocidad de liberación de la BSA en función del contenido en cerámica, el método de introducción de la BSA ("ex situ" o "in situ"), la naturaleza del agente gelificante y el método de secado.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio de liberación simultánea de ibuprofeno y ácido zoledrónico, buscando una liberación más rápida del primero y una liberación más sostenida en el segundo caso. La liberación rápida de ibuprofeno permitiría niveles altos a tiempos cortos tras la implantación del material, evitando la inflamación debida a la intervención quirúrgica. La administración de AINES como el ibuprofeno está también indicada de forma conjunta con bifosfonatos (como el ácido zoledrónico) para evitar la aparición de un síndrome pseudogripal tras la administración de los mismos⁽¹⁾. La liberación más lenta del ácido zoledrónico favorecería la regeneración ósea en el lugar del implante durante períodos largos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la preparación de los soportes porosos 3D se ha utilizado nanohidroxicarbonatoapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$, presente en un 45% en peso y como componente orgánico, el polisacárido agarosa, que actúa como agente gelificante (45% en peso). Las moléculas utilizadas para los estudios de velocidad de liberación han sido: ácido zoledrónico e ibuprofeno (10% del peso total del material).

Obtención de los soportes porosos 3D

El procedimiento se llevó a cabo empleando el sistema GELPOR3D^(2,3) en una cubeta de vidrio conectada a un sistema capaz de controlar la temperatura durante el proceso y con una varilla de vidrio como sistema de agitación, de acuerdo con el esquema de la figura 1. Los fármacos se introdujeron durante el proceso de fabricación del soporte ("in situ") o bien tras el secado, por impregnación de los soportes 3D en una solución acuosa conteniendo los fármacos ("ex situ"). El proceso de secado se realizó de dos modos diferentes: en estufa a 37°C y por liofilización. En este último caso, la temperatura de congelación del material puede modificar la porosidad del material.

Los materiales obtenidos han sido caracterizados por: Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), porosimetría de intrusión de mercurio, difracción de rayos X (DRX) y microscopia electrónica de barrido (MEB).

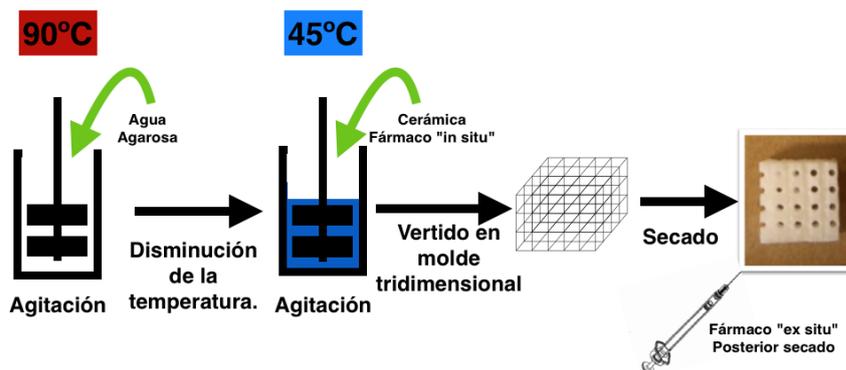


Figura 1. Método de preparación de los soportes 3D cargados con los fármacos

Estudios de liberación “in vitro”

Los estudios de liberación de los fármacos se han realizado en una solución salina (0,9% NaCl) a 37°C y con agitación para imitar las condiciones fisiológicas. El pH se ajustó a 7,4 empleando tris-buffer y HCl. Por otra parte, y con objeto de crear unas condiciones de infección simulada (en un proceso de infección se produce una disminución del pH localmente en la zona afectada), se realizaron estudios de liberación a un pH de 6,5.

Se ha realizado un estudio de liberación dual de ibuprofeno y ácido zoledrónico en función del tiempo. Dado que las muestras contienen ambos fármacos, su separación y cuantificación se realizó mediante un equipo de HPLC en fase reversa (columna de sílice con cadenas laterales de C18) acoplado a un espectrofotómetro UV-visible. La medida de ibuprofeno se hizo a 219 nm y la del ácido zoledrónico a 210 nm. Puesto que los espectros UV-visible de ambos fármacos se solapan, fue necesaria la búsqueda de un método de separación que permitiese cuantificarlos de forma independiente. La separación se realizó por HPLC en gradiente, siendo la fase móvil una mezcla de metanol y una disolución acuosa con ácido fosfórico a pH=3, cuyas proporciones van cambiando (de mayor a menor polaridad). Simultáneamente, durante los ensayos de liberación se determinó el pH y la concentración de calcio en la solución.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los soportes obtenidos poseen, además de los poros tridimensionales interconectados (Fig. 1), de un tamaño entre 700 y 900 micras, un alto porcentaje de porosidad. Así, las muestras liofilizadas que han sido congeladas a -86°C presentan poros de entre 100 y 200 micras⁽²⁾, mientras que las congeladas a -196°C, con

nitrógeno líquido, presentan poros en torno a 10 micras. Estas diferencias pueden apreciarse en las imágenes de microscopía electrónica de barrido.

Los diagramas de DRX de los soportes 3D muestran la presencia de máximos correspondientes a una apatita poco cristalina sobre un fondo amorfo debido a la agarosa. Tanto el ibuprofeno como el ácido zoledrónico se encuentran en estado cristalino. El análisis por FTIR muestra la presencia de bandas asignadas a los componentes del material, y no se aprecian cambios significativos en los números de onda de las bandas, siendo difícil apreciar las posibles interacciones entre los componentes. Los espectros FTIR indican que en los soportes 3D sintetizados el ibuprofeno se encuentra desprotonado. Este hecho podría estar relacionado con la disolución de una pequeña cantidad de hidroxapatita durante la preparación de los soportes, lo que originaría una ligera basificación del medio de síntesis. Esta hipótesis se ve apoyada por la presencia de iones calcio en la disolución en que se lleva a cabo el estudio de liberación, así como la presencia de ibuprofeno protonado en andamios constituidos sólo por agarosa e ibuprofeno.

Los resultados de porcentaje de fármaco liberado en función del tiempo se representan en la figura 2.

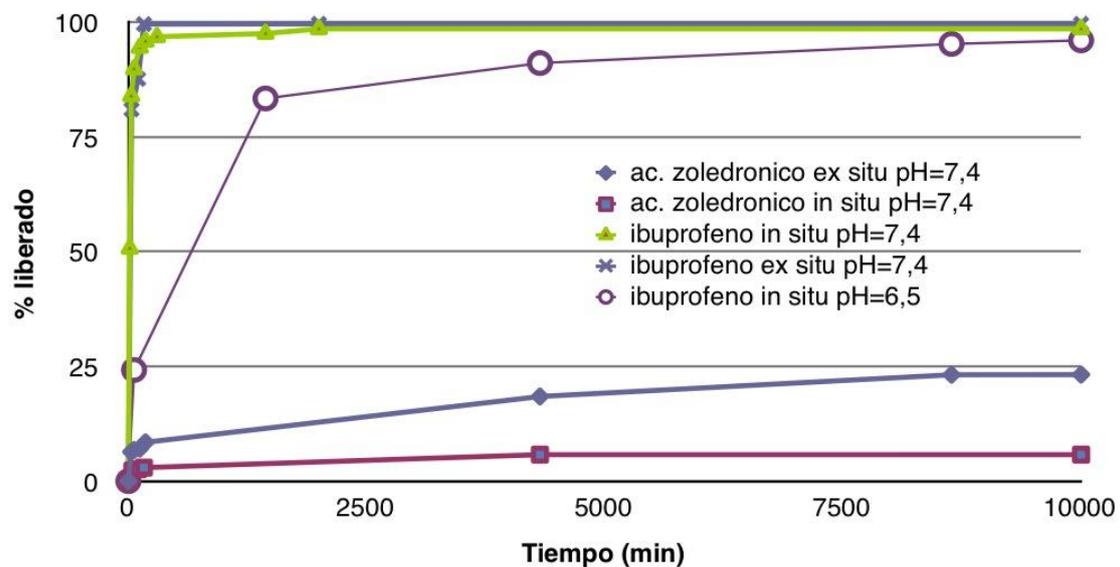


Figura 2. Porcentaje de fármaco liberado en función del tiempo.

Los datos recogidos en la figura 2 muestran que en todos los casos y para un tiempo dado, se libera una mayor cantidad de ibuprofeno que de ácido zoledrónico. Este hecho podría deberse a que el ácido zoledrónico queda retenido en el material debido a una interacción electrostática de los bifosfonatos con los iones calcio presente en la cerámica⁽⁴⁾

La variación de % liberado de ibuprofeno frente al tiempo puede describirse mediante una cinética de liberación de orden uno ($y=0,96216(1-e^{-0,01051x})^{0,1132}$) corregida por un exponente experimental muy alejado de uno, lo que indica una gran cantidad de ibuprofeno liberado en el momento inicial⁽⁵⁾. El material, al comportarse como un hidrogel, absorbe una gran cantidad de agua al introducirse en el medio acuoso, produciéndose un hinchamiento de la muestra, y la salida de ibuprofeno del material, "arrastrado" por esta cantidad de agua que entra en el material, lo que se conoce como "efecto burst". A pH=6,5, se aprecia una cierta disminución en la velocidad de liberación del ibuprofeno, debida a una disminución de la solubilidad del fármaco a ese pH.

En el caso del ácido zoledrónico se observa un porcentaje liberado mayor cuando se introduce por impregnación ("ex situ"), posiblemente porque cuando el fármaco se introduce durante el proceso de síntesis se favorece una mayor retención por el polímero y la interacción con la cerámica se favorece más.

CONCLUSIONES

Se han preparado soportes porosos tridimensionales, biocompatibles y biodegradables, para regeneración ósea que permiten la liberación controlada de dos fármacos con distinta actividad farmacológica. Los materiales obtenidos presentan una liberación lenta de un agente antiosteoporótico (ácido zoledrónico) y una liberación más rápida de un antiinflamatorio (ibuprofeno) lo que mejora considerablemente su posible utilización como sustitutos óseos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Black, D.M. Once-Yearly Zoledronic Acid for Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 356:1809-1822
2. Román, J., Cabañas, M.V., Peña, J., Vallet-Regí, M.V. Control of the pore architecture in three-dimensional hydroxyapatite- reinforced hydrogel scaffolds. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 12 (2011) 045003 (9pp) doi:10.1088/1468-6996/12/4/045003
3. Peña, J., Román, J., Cabañas, M.V., Vallet-Regí, M.V. An alternative technique to shape scaffolds with hierarchical porosity at physiological temperature. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 1288–1296
4. Nancollas, G. H., et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 38 (2006) 617–627

5. Nieto, A., Balas, F., Colilla, M., Manzano, M., Vallet-Regí, M.V. Functionalization degree of SBA-15 as key factor to modulate sodium alendronate dosage. *Microporous and Mesoporous Materials* 116 (2008) 4–13

Recibido: 16 marzo 2012.

Aceptado: 16 diciembre 2013.