

ESTUDIO CINÉTICO DE LIBERACIÓN IN VITRO EN UN BIOMATERIAL COMPUESTO POR HAP-200/POVIAC/CaCO₃.

**Javier Aragón Fernández, Ramón González Santos, Nayrim Brizuela Guerra,
Lisy Oliver Valdés**

Laboratorio de Biomateriales, Departamento de Investigación-Desarrollo, Dirección de Química, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.
Correo electrónico: javier.aragon@cnic.edu.cu

Recibido: Diciembre de 2008; Aceptado: Noviembre de 2009

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la cinética de liberación *in vitro* de un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO₃, con el fin de demostrar que puede ser utilizado como un sistema de liberación controlado de fármacos, durante periodos de tiempo prolongados. Además se estudio el efecto que provoca la adición de carbonato de calcio tipo *Aragonite* y el contenido de poli(acetato de vinilo) en los perfiles de liberación de este biomaterial. Se demostró que los biomateriales compuestos por HAP-200/POVIAC/CaCO₃ pueden ser utilizados como sistema de liberación controlada de aspirina. Por otro lado, se evidenció que tanto el aumento del contenido de poli(acetato de vinilo) en el biomaterial estudiado, como la adición de carbonato de calcio a las formulaciones provoca una disminución de la velocidad de liberación de aspirina. Finalmente, se comprobó que la liberación de aspirina tiene lugar mediante un mecanismo de difusión tipo *Fickian*, a través de los canales formados en el biomaterial compuesto una vez en contacto con la disolución tampón de fosfato.

Palabras clave: Biomateriales, sistema de liberación controlada, difusión *Fickiana*.

ABSTRACT

The main objective of this work is to describe the kinetics of the drug release from a biomaterial compound by HAP-200/POVIAC/CaCO₃, with the purpose of demonstrating that it can be used as a drug delivery system, during a long period of time. Also, it was studied the effect caused by the addition of calcium carbonate and content of polyvinyl acetate in the release profiles of this biomaterial. It was demonstrated that biomaterials compound by HAP-200/POVIAC/CaCO₃ can be used as a controlled release systems of aspirin. On the other hand, it was evidenced that increase of the polyvinyl acetate content and the addition of calcium carbonate in the formulations, causes a decrease in the speed of aspirin release. Finally, it was found that the aspirin release from this biomaterial is carried out through a diffusion mechanism of *Fickian* type, through the channels formed in the composite biomaterial once in contact with the phosphate buffer solution.

Key words: Biomaterials, controlled delivery systems, in vitro and *Fickian* diffusion.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de biomateriales compuestos como sistemas de liberación controlada de fármacos ha despertado la atención de los especialistas en las últimas décadas debido a las diversas ventajas que estos presentan en la práctica médica [1]. La incorporación de fármacos en los biomateriales implantables es sumamente importante, ya que en cualquier intervención quirúrgica el riesgo de infección, inflamación y dolor es muy elevado. Por lo que, si el medicamento es incorporado al implante, no cabe duda que este actuará mayoritariamente de forma local sin perjudicar otras zonas del organismo, disminuyendo los efectos secundarios perjudiciales, con lo que se evitan periodos de tiempo prolongados en las terapias post-operatorias [2].

Los biomateriales compuestos, constituidos por una cerámica y un polímero, pueden ser capaces de combinar las propiedades de cada uno de los componentes, dando lugar a un *composite* que presenta una doble función. En primer lugar, rellenar el defecto óseo, ayudando a regenerar el tejido y en segundo lugar, actuar como sistema de liberación controlada de fármaco de forma local. Ambos componentes (cerámica y matriz polimérica), intervienen en los dos aspectos, no obstante, es generalmente la cerámica quien atribuye el carácter bioactivo al biomaterial, mientras que el polímero es el encargado de controlar el proceso de liberación del fármaco ocluido [3,4].

Desde hace algunos años en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) se vienen investigando biomateriales compuestos por hidroxiapatita *Coralina* (HAP-200), carbonato de calcio (CaCO_3) tipo *Aragonite* (proveniente de los corales marinos) y poli(acetato de vinilo) (POVIAC) [5,6]. Los resultados obtenidos en la caracterización físico-química de estos biomateriales, indican que constituye un buen prototipo para ser utilizado como sustituto del injerto óseo y tratar simultáneamente diferentes patologías del hueso [7].

Por este motivo, el objetivo principal de este trabajo es estudiar la cinética de liberación *in vitro* que presenta este tipo de biomaterial, para demostrar que puede ser utilizado como un sistema de liberación controlada de fármacos, durante periodos de tiempo prolongados.

Para evaluar la utilización de estos biomateriales como sistemas de liberación controlada de fármacos, se seleccionó la aspirina (ASA) como fármaco modelo. Debido al efecto analgésico y antiinflamatorio que proporciona este medicamento, a su gran disponibilidad en el mercado y a la existencia de diversos reportes [7,8].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Planeamiento experimental. Se realizó un diseño de experimento factorial mezclado, donde se variaron dos factores experimentales, el factor "contenido de POVIAC" (con tres niveles 15, 17,5 y 20%) y el factor "contenido de CaCO₃" (con dos niveles 0 y 15%), generándose una matriz experimental de seis formulaciones a estudiar (véase la Tabla 1), y como variable respuesta se escogió la cantidad de ASA liberada a las 72 y 360 horas.

Tabla 1. Composición de las formulaciones generadas en el diseño de experimento.

<i>Formulación</i>	<i>POVIAC</i>	<i>CaCO3</i>	<i>HAP-200</i>	<i>ASA</i>
P15-Ca0	15	-	75	10
P15-Ca15	15	15	60	10
P17,5-Ca0	17,5	-	72,5	10
P17,5-Ca15	17,5	15	57,5	10
P20-Ca0	20	-	70	10
P20-Ca15	20	15	55	10

Para el análisis estadístico de la matriz generada en el diseño de experimento propuesto, se prepararon cinco réplicas de cada formulación y el Análisis de Varianza se realizó mediante la tabla de ANOVA, utilizando el programa estadístico Statgraphics versión 5.1.

2.2. Obtención de las formulaciones. En todos los casos las formulaciones fueron preparadas mezclando lo más homogéneamente posible en un mortero de ágata, la fase sólida compuesta por HAP-200, CaCO₃ y ASA, según la Tabla 1. Posteriormente, se humectó la mezcla con una disolución alcohólica de POVIAC al 39 % hasta la formación de una pasta homogénea. Inmediatamente después, se adicionó agua destilada y se continuó mezclando, hasta que la pasta adquirió mayor consistencia y pudo colocarse en los moldes a ensayar (6 mm de altura y 12 mm de diámetro). Finalmente las formulaciones se dejaron reposar en una desecadora durante 24 horas a temperatura ambiente.

2.3 Ensayos de liberación de ASA "in vitro". Para obtener los perfiles de liberación se prepararon cinco réplicas de cada formulación, las cuales fueron colocadas en un pesafiltro y se les adicionó 10 mL de una disolución buffer de fosfato. Esta disolución fue preparada previamente, adicionando 8,0 mmol de K₂HPO₄·3H₂O, 2,0 mmol de KH₂PO₄, 2,7 mmol de KCl y 13,7 mmol de NaCl en 500 mL de agua destilada y desionizada contenida en un frasco de polietileno de 1000 mL. Posteriormente se traspasa cuantitativamente esta disolución a un matraz aforado de 1 L y se enrasa con agua destilada y desionizada. El pH de esta disolución, a 37°C, es 7,40 ± 0,05. Luego todos los pesafiltros se taparon y se introdujeron en una

incubadora *BOXCOULT* a $37,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ durante 360 horas (15 días). Periódicamente la disolución buffer de fosfato en contacto con las formulaciones fue extraída completamente y reemplazada por una cantidad igual de disolución fresca. La disolución extraída fue conservada en frascos de vidrio herméticamente tapados y mantenidos a -20°C hasta el momento del análisis. Las extracciones se realizaron cada una hora durante las primeras ocho horas y cada 24 horas durante todo el tiempo de estudio.

La determinación de la cantidad de ASA liberada en cada instante de tiempo, se realizó en un espectrofotómetro UV-Visible (*ULTROSPEC 2000*) a una longitud de onda de 298 nm, empleando una curva de calibración (5, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm) de ASA en una disolución tampón de fosfato.

2.4 Estudio cinético de liberación in vitro de Aspirina. Entre los modelos matemáticos más utilizados para analizar y describir el mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de liberación se encuentran los propuestos por *Higuchi* en 1963 y *Korsmeyer* y *Peppas* en 1983 [9,10].

Higuchi propuso un modelo matemático ampliamente utilizado para describir el proceso empírico de liberación de fármacos, el cual cumple con la *Ley de Fick* y se representa de la siguiente forma:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = K \cdot t^{1/2} \quad (1)$$

donde M_t/M_{∞} es la fracción de ASA liberada en un tiempo t y k es la constante de velocidad de liberación.

Por otro lado, *Korsmeyer* y *Peppas* propusieron un modelo matemático que es generalmente lineal para valores de $M_t/M_{\infty} < 0,6$. Este modelo intenta explicar mecanismos de liberación de fármacos donde se presenta erosión y/o disolución de la matriz, y no es más que una forma generalizada de la ecuación de *Higuchi* que se expresa como:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = K \cdot t^n \quad (2)$$

Donde k es la constante de velocidad de liberación que incorpora características estructurales y geométricas del sistema de liberación y n es el exponente que indica el mecanismo mediante el cual ocurre la liberación del fármaco (ASA).

El valor del exponente n brinda información sobre la cinética de liberación del fármaco, por lo que si n es igual a 0,5, la liberación del fármaco tiene lugar a través de un fenómeno de

difusión de tipo *Fickian* (modelo matemático de *Higuchi*), si n toma valores entre 0,5 y 1 indica que la liberación del fármaco es debida a un mecanismo de difusión no Fickian o anómalo y cuando n es igual a 1, el mecanismo de liberación del fármaco depende del proceso de relajación de las cadenas poliméricas [11].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Interpretación de los perfiles de liberación. Se pudo observar que en todas las formulaciones estudiadas, la liberación de ASA ocurre mediante un proceso de difusión a través de poros, grietas o cavidades presentes en el biomaterial compuesto (véase la Figura 1). Estos defectos se crean ya que el POVIAC incorporado es capaz de absorber la disolución buffer de fosfato hacia el interior del biomaterial compuesto, provocando la formación de una fase mixta polímero-disolución.

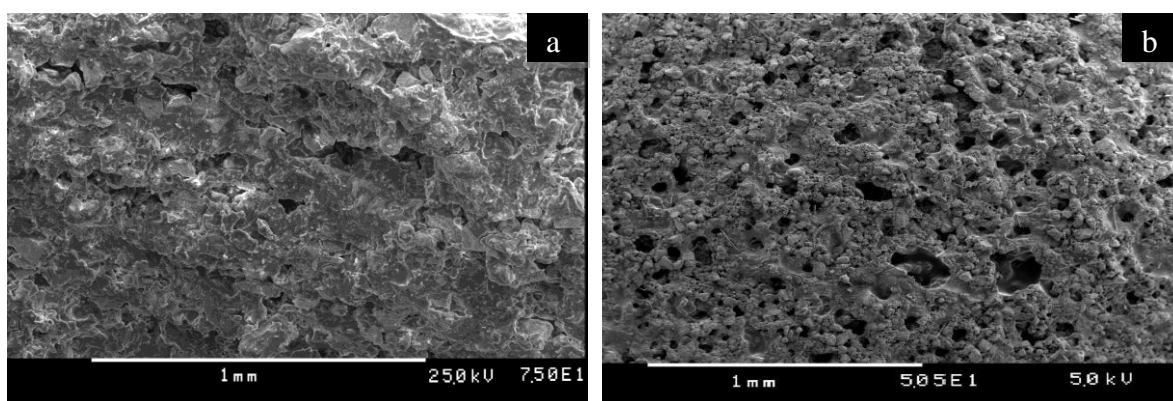


Figura 1. Morfología en la superficie de la formulación P17,5-Ca15 antes (a) y después (b) de concluido el estudio de liberación de ASA.

Según *Pérez y col.* [12], una vez alcanzada cierta concentración de disolución dentro del biomaterial compuesto, esta fase se hace inestable y se separa en dos nuevas fases, una rica en polímero y otra rica en la disolución que penetra. Esta última fase continúa su difusión hacia el interior del biomaterial compuesto, repitiéndose innumerables veces la separación de la fase mixta polímero-disolución, lo que trae como resultado la formación de un gran número de gotas que llegan a tocarse entre sí, dando lugar a diversos canales por los que puede difundir el fármaco hacia el exterior (véase la Figura 2).

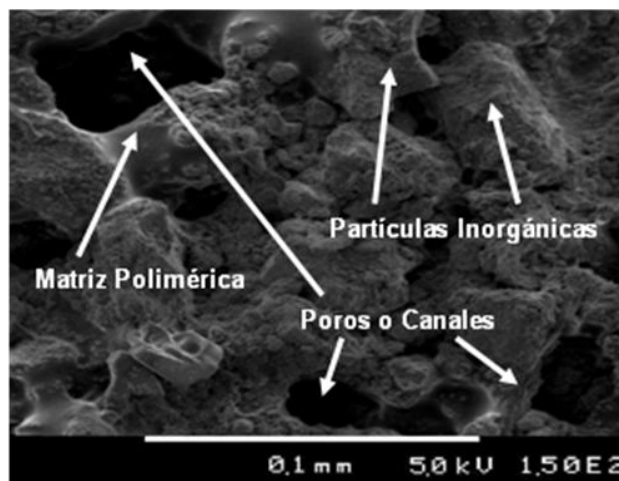


Figura 2. Morfología en la superficie de la formulación P17,5-Ca0 después de concluido el estudio de liberación de ASA.

Por tanto, es de esperar que al aumentar el contenido de POVIAC en las formulaciones con igual contenido de CaCO_3 , disminuya la cantidad de ASA liberada. Este comportamiento se debe a que la difusión del fármaco a través de los defectos creados en el biomaterial compuesto, dependerá del avance de la fase mixta polímero-disolución. Por tanto, mientras mayor sea el contenido de POVIAC incorporado al biomaterial compuesto, mayor será su capacidad de absorción y la fase mixta avanzará lentamente dentro del biomaterial compuesto.

El estudio de liberación *in vitro* realizado a las formulaciones que no contienen CaCO_3 (P15 - Ca0, P17,5 - Ca0 y P20 - Ca0) muestra que en las primeras ocho horas los perfiles de liberación de estas formulaciones son similares (Pendiente; $B = 4$), liberando un $35,5 \pm 0,1\%$ de ASA (véase la Figura 3). A partir de este momento y hasta las 72 horas se puede observar que la pendiente de cada perfil de liberación ($B = 0,2$) disminuye, lo que indica que el polímero en estas formulaciones comienza a ejercer un control sobre el mecanismo de liberación de ASA en el biomaterial compuesto. Después de transcurridas 72 horas la pendiente de cada perfil de liberación es casi cero ($B = 0,0009$), por lo que se puede afirmar que la cantidad de ASA liberada al medio es casi nula.

Por otra parte, después de transcurridas 8 horas se puede observar que las formulaciones con mayor contenido de POVIAC liberan una menor cantidad de ASA al medio. Este comportamiento es similar a lo reportado en la literatura para muestras similares [5,7]. Además, en estas formulaciones la cantidad de ASA liberada al medio entre las 72 y las 360 horas no sufrió variaciones significativas. A partir de los resultados obtenidos hasta el momento, se puede afirmar que estos biomateriales pueden ser utilizados como sistemas de liberación controlada de ASA durante 72 horas, y la cantidad de ASA liberada en cada instante de tiempo dependerá del contenido de POVIAC incorporado.

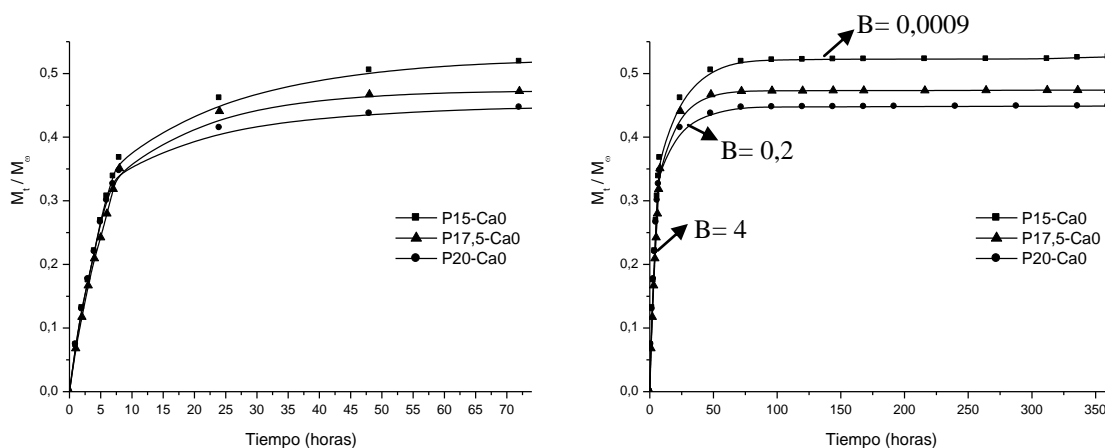


Figura 3. Perfil de liberación de ASA en las formulaciones que no contienen CaCO_3 .

En el caso de las formulaciones que contienen CaCO_3 (P15 - Ca15, P17,5 - Ca15 y P20 - Ca15) se encontró un resultado similar en cuanto a la disminución de la pendiente en el tiempo, aunque la liberación de ASA es de forma continua durante todo el tiempo de estudio (véase la Figura 4). Este comportamiento permite afirmar que estos biomateriales pueden ser utilizados como sistemas de liberación controlada de ASA durante 360 horas (15 días), y la cantidad de ASA liberada en cada instante de tiempo dependerá del contenido de POVIAC incorporado. Es importante destacar que las formulaciones que menor cantidad de ASA liberan en cada instante de tiempo corresponden a las de mayor contenido de POVIAC.

En la comparación realizada entre las formulaciones con igual contenido de POVIAC y diferente contenido de CaCO_3 , se puede apreciar como en todos los casos la cantidad de ASA liberada al medio disminuye considerablemente en las formulaciones que contienen CaCO_3 (véase la Figura 5). Este comportamiento es típico de los sistemas de liberación que contienen un agente retardador, que en este caso sería el CaCO_3 .

Además, en todos los casos las formulaciones que contienen CaCO_3 presentan un perfil de liberación sostenida de ASA durante todo el tiempo de estudio. Mientras que en las formulaciones que no contienen CaCO_3 se puede observar como a partir de las 72 horas la liberación de ASA al medio fue casi nula (véase la Tabla 2).

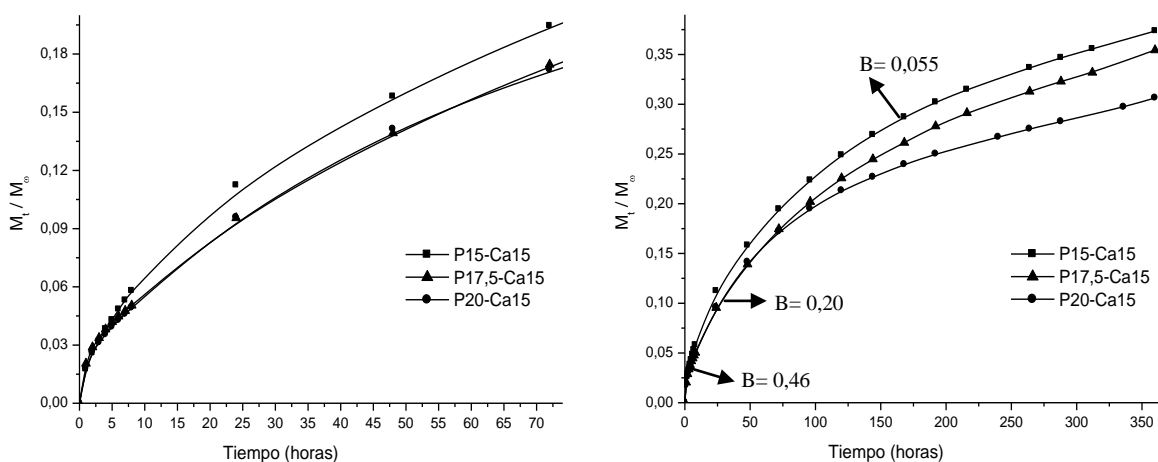


Figura. 4. Perfil de liberación de ASA en las formulaciones que contienen CaCO_3 .

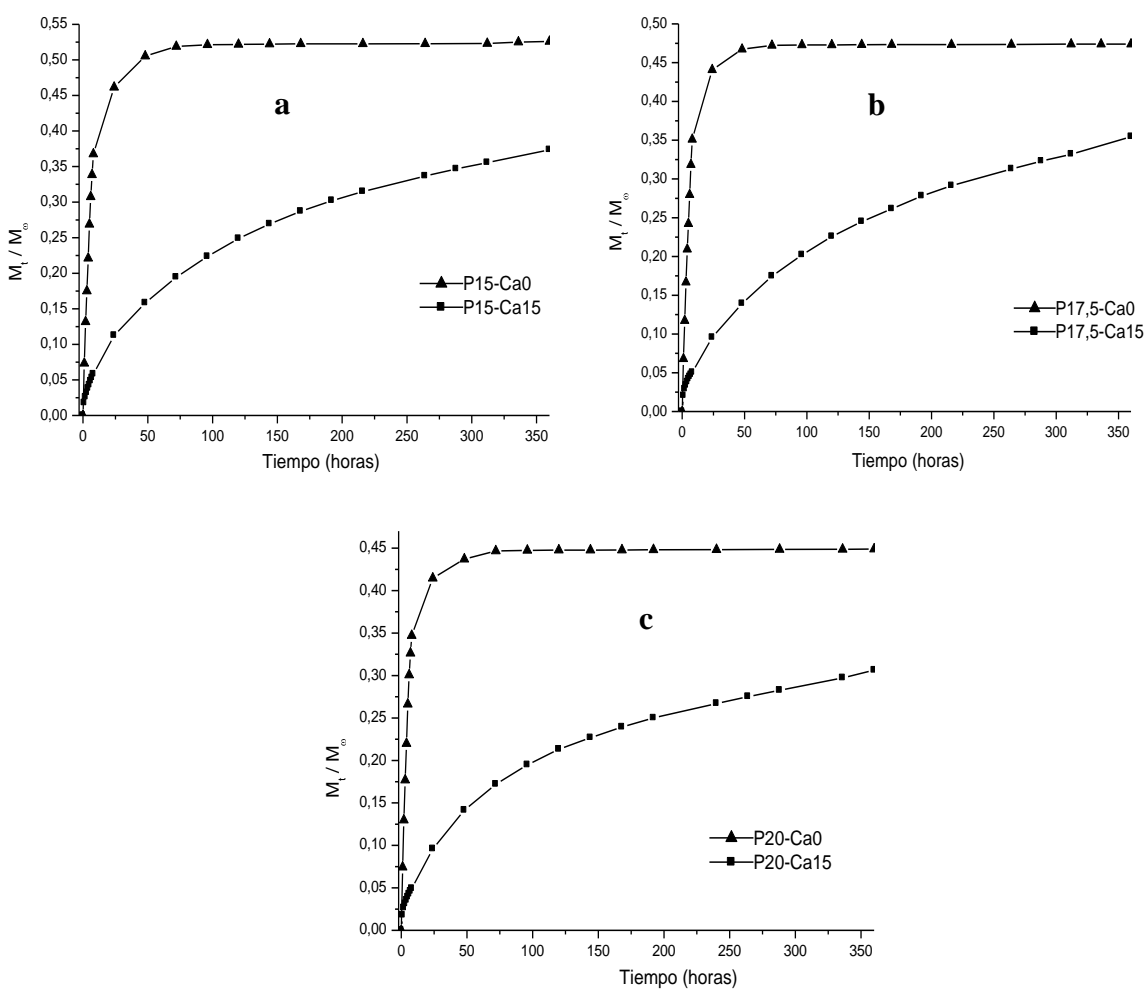


Figura 5. Comparación de los perfiles de liberación de ASA en las formulaciones que presentan igual contenido de POVIAC (a-15 %, b-17,5 % y c-20 %) y diferente contenido de CaCO_3 .

Tabla 2. Liberación de ASA al cabo de las 8, 72 y 360 horas.

<i>Formulación</i>	<i>Cantidad de ASA liberada (%)</i>		
	<i>8 horas</i>	<i>72 horas</i>	<i>360 horas</i>
P15-Ca0	36 ± 1	52 ± 8	52 ± 8
P15-Ca15	5,8 ± 0,5	19 ± 2	37 ± 3
P17,5-Ca0	35 ± 1	47 ± 1	47 ± 1
P17,5-Ca15	5,0 ± 0,6	18 ± 3	35 ± 5
P20-Ca0	34 ± 2	45 ± 5	45 ± 5
P20-Ca15	4,9 ± 0,5	17 ± 1	30 ± 3

Por otro lado, según el análisis de varianza realizado al diseño de experimento planteado, la incorporación de CaCO₃ provocó un efecto significativo en el contenido de ASA liberado al medio a las 72 y 360 horas (ANOVA, $p = 0,0002$ y $0,0004$, respectivamente). Este resultado permite corroborar que el CaCO₃ actúa como agente retardador en este tipo de biomaterial compuesto. Sin embargo, aunque en los perfiles de liberación de todas las formulaciones se pudo observar que la cantidad de ASA liberada al medio disminuía notablemente al aumentar el contenido de POVIAC en las formulaciones con igual contenido de CaCO₃. La variación del contenido de POVIAC no provocó un efecto significativo (ANOVA, $p > 0,05$) en la liberación de ASA al medio a las 72 y 360 horas (véase las Figuras 3 y 4).

3.2. Ajuste de los modelos matemáticos analizados. Con el objetivo de estudiar el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la liberación de ASA desde un biomaterial compuesto, se ajustó la media de los perfiles de liberación obtenidos de todas las formulaciones, a las ecuaciones propuestas por Higuchi en 1963 y Korsmeyer y Peppas en 1983. Los coeficientes de correlación lineal (r) obtenidos en todos los casos, evidenciaron que las formulaciones que no contienen CaCO₃, no presentan un buen ajuste a los modelos evaluados (véase la Tabla 3). Además, en estas formulaciones, la ordenada en el origen calculada mediante el modelo propuesto por Higuchi, es significativamente diferente de cero y en el modelo propuesto por Korsmeyer y Peppas, el valor del exponente n ($0,23 < n < 0,27$) no corresponden a ninguno de los intervalos descritos por Katime [11], lo que indica la existencia de varios procesos simultáneos al fenómeno de difusión de ASA.

Tabla 3. Ajuste de los perfiles de liberación de ASA.

<i>Formulación</i>	<i>Higuchi</i>			<i>Peppas y Korsmeyer</i>		
	<i>k</i>	<i>Ord. origen</i>	<i>r</i>	<i>k</i>	<i>n</i>	<i>r</i>
P15-Ca0	0,018±0,003	0,20±0,03	0,78439	0,1510	0,23±0,03	0,85748
P15-Ca15	0,0213±0,0004	0,001±0,004	0,99697	0,0192	0,52±0,01	0,99816
P17,5-Ca0	0,019±0,003	0,20±0,03	0,80019	0,1350	0,27±0,04	0,87580
P17,5-Ca15	0,0196±0,0002	0,001±0,002	0,99844	0,0187	0,50±0,01	0,99890
P20-Ca0	0,022±0,003	0,21±0,04	0,81777	0,1450	0,27±0,04	0,88627
P20-Ca15	0,0172±0,0004	0,007±0,004	0,99708	0,0182	0,48±0,01	0,99769

Este resultado puede deberse, a que el proceso de formación de canales dentro del biomaterial es acompañado de la salida de aire ocluido en el interior de estas formulaciones, provocando la ruptura de segmentos de la matriz polimérica que debilitan la capacidad cohesiva de este biomaterial compuesto. Este comportamiento provocó que las formulaciones comenzaran a agrietarse a partir de las 24 horas y se desintegraran completamente entre los días 10 y 15. Además, la velocidad de liberación de ASA fuera superior en estos casos, ya que en apenas 72 horas se liberó la mayor cantidad de fármaco a lo largo del estudio.

En el caso de las formulaciones que contienen CaCO_3 , se percibió que este material es capaz de actuar como relleno mineral, aportando poca flexibilidad al biomaterial y facilitando que estas formulaciones conservaran su forma durante todo el tiempo de estudio. En ellas se pudo apreciar, que la velocidad de liberación de ASA es muy similar, liberándose al cabo de los tres días solo un 17, 18 y 19% de la cantidad total de ASA, siendo necesarios 15 días para alcanzar valores de 30, 35 y 37% respectivamente. Por tanto, se puede decir que la adición de CaCO_3 en las formulaciones permite lograr una liberación sostenida de ASA en el tiempo, controlada por un aumento del contenido de POVIAC en dicho biomaterial compuesto (véase la Figura 3).

Por otro lado, se observa que el coeficiente de correlación lineal de las formulaciones que contienen CaCO_3 son muy similares entre si y superiores a los presentados por las formulaciones que no poseen CaCO_3 . Al mismo tiempo, la ordenada en el origen calculada según el modelo propuesto por *Higuchi* es significativamente igual a cero, y los valores de *n* calculados según la ecuación propuesta por *Korsmeyer* y *Peppas* son significativamente igual a 0,50. Esto se debe, a que en estas formulaciones la liberación de ASA transcurre mediante un proceso de difusión de tipo *Fickian* a través de los canales formados en estas

formulaciones, una vez en contacto con la disolución buffer de fosfato (véase las Figuras 1b y 2). Según ambos modelos, la formulación que mayor constante de velocidad (k) de liberación de ASA presenta es la que contiene un 15 % de POVIAC, esto confirma las observaciones realizadas anteriormente en el análisis de los perfiles de liberación.

CONCLUSIONES

Se demostró que los biomateriales compuestos por HAP-200/POVIAC y HAP-200/POVIAC/CaCO₃ pueden ser utilizados como sistemas de liberación controlada de ASA en diferentes periodos de tiempo. Además, la liberación de ASA soportada en este tipo de biomaterial ocurre mediante un proceso de difusión tipo *Fickian* a través de los canales formados una vez en contacto con la disolución buffer de fosfato. Al mismo tiempo, se comprobó que la adición de CaCO₃ dentro de este tipo de biomaterial compuesto ejerce un efecto significativo en la liberación de ASA en cada instante de tiempo para formulaciones con igual contenido de POVIAC y a su vez, permite un ajuste apropiado de los perfiles de liberación a los modelos propuesto por *Higuchi* en 1963 y *Korsmeyer y Peppas* en 1983.

Agradecimientos. Los autores desean expresar su agradecimiento al *M.Sc. Gastón Fuentes Estévez* por la asesoría y apoyo técnico brindado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sáez V, Hernández E, Angulo L, Katime I, *Rev. Iberoam. Polim.*, **5**, 87 (2004)
2. Grenier L, González R, *Biomédica*, **14**, 30 (1994)
3. Horcajada P, Rámila A, Pérez-Pariente J, Vallet-Regí M, *Micropor. Mesopor. Mat.*, **68**, 105 (2004)
4. Doadrio AL, Sousa EMB, Doadrio JC, Pérez-Pariente J, Izquierdobarba I, Vallet-Regí M, *J. Control Release*, **97**, 125 (2004)
5. Arias D, González R, *Revista CENIC, Ciencias Químicas*, **35**, 101 (2004)
6. Aragón J "Obtención de un biomaterial compuesto capaz de actuar como un sistema de liberación controlada". Tesis de Licenciatura. La Habana, Cuba. Universidad de la Habana, 2005
7. Aragón J, Brizuela N, González R, *Revista CENIC, Ciencias Químicas*, **37**, 179 (2006)
8. Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, Fox JL, Higuchi WI, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 259 (1994)
9. Higuchi T, *J. Pharm. Sci.*, **52**, 1145 (1963)
10. Korsmeyer RW, Peppas NA, "Controlled Release Delivery Systems" (editors). T. J. Roseman y S.Z. Mansdorf, Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1983)

11. Katime I, Katime O, Katime D, "Los materiales inteligentes de este Milenio: los hidrogeles polímero". Servicio Editorial Universidad del País Vasco. Bilbao 2004
12. Pérez M, Suzarte A, Jordán G, Larios C, Villegas R, *Revista CENIC, Ciencias Químicas*, **34**, 67 (2003)