

CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES CON BASE DE ÁCIDO ITACÓNICO PARA LA LIBERACIÓN DE CICLOSPORINA

Judith Cornejo^{a)}, Eduardo Mendizábal^{a)}, Maite Rentería^{a*}), Issa Katime^{b)}

a) Departamento de Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán #1451, C.P. 44430. Guadalajara, Jalisco (México). Correo electrónico: reurmate@yahoo.es

b) Grupo de Nuevos Materiales; Departamento de Química-Física; Facultad de Ciencia y Tecnología; Universidad del País Vasco; Barrio Sarriena s/n; apartado 644, 48080 Bilbao, Vizcaya, España. Correo electrónico: issa.katime@ehu.es

Enviado: Diciembre 2012; Aceptado: Febrero 2013

RESUMEN

La ciclosporina es una droga utilizada para evitar el rechazo del organismo hacia un órgano transplantado. El presente trabajo se centró en el diseño de un sistema de transporte y liberación adecuada de la droga, basado en hidrogeles y cuya forma de administración es oral. Se estudió el efecto de la composición de los sistemas poliméricos (hidrogeles) formados por N-isopropilacrilamida y ácido itaconíco (NIPA/AI) y ácido acrílico y ácido itaconíco (AA/AI), en la liberación controlada del fármaco. Se siguieron cinéticas de liberación de dicho medicamento desde los hidrogeles a diferentes pH's (simulando las condiciones del estómago, intestino grueso e intestino delgado). Los resultados mostraron, que el sistema elegido, es capaz de soportar el pH ácido del estómago, apenas liberando un poco de la ciclosporina en él, al aumentar el pH (4,5 y 6,8) se libera una mayor cantidad del fármaco

Palabras clave: hidrogeles poliméricos, liberación de fármaco, ciclosporina

ABSTRACT

Cyclosporine is a drug used to prevent the rejection when an organ is transplanted. The present research was focused on the design of a system to transport and release the drug, is based on hydrogels for oral administration prepared in an oral presentation. The effect of the composition of polymeric systems (hydrogels) formed by N-isopropylacrilamida and itaconic acid (NIPA/AI) and acrylic acid and itaconic acid (AA/AI), in the controlled release of the drug was analyzed. The drug absorption and release kinetics were followed with these systems to at different pH's, (stomach, large intestine and small intestine conditions were simulated). The results showed that the polymeric systems were able to withstand the stomach acidic pH where a small amount of the drug is liberated, however, increasing pH at 4.5 and above a larger amount of the drug is released. optimally.

Keywords: polymeric hydrogels, drug release, cyclosporine

1. INTRODUCCIÓN

La demanda de hidrogeles se ha incrementado considerablemente debido a su gran versatilidad en aplicaciones, sobre todo en el área de la biomedicina ya que han demostrado tener muy buenas características de biocompatibilidad con el organismo humano. Esta compatibilidad se debe a su alto contenido en agua, su consistencia blanda y elástica y su baja tensión interfacial propiedades que los hacen semejantes a los tejidos vivos [1]. Además, los hidrogeles permiten modular la cinética de liberación de ciertos principios activos por lo que pueden diseñarse para liberar fármacos de forma específica, predeterminada, predecible y por períodos de tiempos programados [2,3].

Katchalsky en 1941 reportó la síntesis de un hidrogel entrecruzado de un polielectrolito soluble el cual se hinchaba y se contraía en respuesta a los cambios del pH, la temperatura y la fuerza iónica [4]. Posteriormente se reportó que los hidrogeles de n-isopropilacrilamida (NIPA) responden a cambios de temperatura (polímeros termosensibles), colapsan cuando se calientan por encima de su temperatura de disolución crítica inferior (LCST) la cual se encuentra localizada alrededor de 31–34°C. Los hidrogeles termosensibles de poliNIPA son potencialmente útiles para aplicaciones como vehículos en la liberación controlada de fármacos [5]. El uso de los hidrogeles en el área de la liberación controlada de fármacos empezó en 1966, cuando *Long* y *Folkman* utilizaron un transportador de polisilano para la liberación controlada de fármacos y otros agentes bioactivos [3]. Estas sustancias se distribuyen a través del organismo de acuerdo con sus propiedades físicas, solubilidad, coeficiente de partición y carga.

Teniendo en cuenta estas las propiedades de la NIPA y la necesidad de un sistema sensible también al pH del medio, en este trabajo se reporta la síntesis y la cinética de hinchamiento de copolímeros de NIPA y ácido itacónico. También se reporta la capacidad de absorber un fármaco y la velocidad a la cual la libera.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Monómeros. Se utilizaron como monómeros el ácido itacónico (AI) (*Lancaster*), el ácido acrílico (AA) (*Lancaster*) y la N-isopropilacrilamida (NIPA) (*Lab. Acros Organics*). El agente entrecruzante fue la N, N'-metilenbisacrilamida (BIS) o (NMBA) de *Aldrich*, todos calidad para análisis.

Iniciador. Se utilizó el dihidrocloruro de 2, 2'-azobis(2-amidinopropano) (V-50) de *Aldrich*.

Disolventes. Se utilizó agua destilada calidad inyectable, con una conductividad de 1 μ s, y metanol grado HPLC (*Golden Bell*) (MeOH).

Fármaco utilizado en el proceso de liberación. El fármaco utilizado fue la ciclosporina (CyA), suministrada por el laboratorio farmacéutico *Gelpharma, Guadalajara, Jalisco, México*.

2.2. Preparación de los hidrogeles por copolimerización radical. Se tomaron dos relaciones místicas disolvente/monómeros de 75/25 y 82/18 y una relación monomérica de 85/15. La cantidad de iniciador y entrecruzante fue del 1% con respecto a los monómeros. Los reactivos se pesaron en un tubo de ensayo y se disolvieron en el disolvente considerado (metanol o agua), según el tipo de sistema a sintetizar. La mezcla de reacción se burbujeó con nitrógeno y a continuación se desgasificó. Las temperaturas de polimerización fueron 25 y 40°C y el tiempo de reacción de 24

horas. Los hidrogeles obtenidos se sacaron de los tubos, se cortaron en cilindros y se lavaron con metanol o agua destilada, para eliminar cualquier impureza hidrosoluble que no hubiese reaccionado. Se dejaron secar durante una semana a temperatura ambiente y después varios días más en la estufa a 40°C, hasta alcanzar peso constante. Una vez secos, se lijaron por ambas caras para obtener superficies lisas, paralelas y uniformes. Las dimensiones de los discos resultantes fueron de 8,5 mm de diámetro y 1,8 mm de espesor.

2.3. Estudios de hinchamiento. El proceso de hinchamiento de los hidrogeles se estudió por gravimetría hasta peso constante en agua a diferentes pHs. Los estudios se realizaron introduciendo las pastillas secas de polímero (xerogel), previamente pesadas, en un baño con agua destilada y desionizada a $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ y la influencia del pH en el hinchamiento, se analizó usando agua bidestilada a pH 4 y pH 7, manteniendo la temperatura a $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Estos valores de pH, se ajustaron antes de sumergir las pastillas, utilizando ácido clorhídrico (0,1 N) o hidróxido de sodio (0,1 N). A diferentes lapsos de tiempo se sacaban las pastillas del agua, se eliminaba el agua en exceso usando un papel filtro y se pesaban para determinar la cantidad de agua absorbida. El porcentaje de hidratación o índice de hinchamiento en peso, se puede expresar matemáticamente de la siguiente manera:

$$\% \text{ H} = \left(\frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}} \right) \times 100$$

Incorporación del fármaco en el hidrogel. El fármaco se incorporó, introduciendo las pastillas secas de polímero (xerogel), previamente pesadas, en disoluciones de fármaco (ciclosporina) con concentraciones de 1,0; 2,6 y 5,0 mg·mL⁻¹. Se usó una mezcla de metanol/agua 1:1 (relación mísica) como disolvente, y la temperatura fue $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

2.4. Estudios de liberación del fármaco. Se consideraron cinéticas de liberación de ciclosporina en soluciones buffer a diferentes pH (1,6, 4,5 y 6,8), similares a los del tracto gastrointestinal, y a una temperatura de $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Para mantener los pH seleccionados, se utilizaron diferentes soluciones, pH de 1,6 (HCl), pH de 4,5 (solución tampón de acetatos) y pH de 6,8 (tampón de fosfatos).

Para la liberación se utilizó un matraz de dos bocas de vidrio, con una capacidad de 100 mL, con agitación magnética constante. En el matraz se pusieron 60 mL de la solución con el pH deseado y a continuación se agregó el xerogel cargado. Durante el estudio, se tomaron pequeñas alícuotas (menos de 1,5 mL en total) para determinar, mediante cromatografía líquida de alta

resolución (HPLC) provisto de un detector de UV, la concentración de ciclosporina liberada. La columna que se uso fue la *Agilent Zorbax SB-C18* con fase reversible 4,6 mm de diámetro por 250 mm de largo, con un tamaño de poro de 5 μm . La fase móvil fue acetonitrilo/agua 70:30 a un flujo de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y una temperatura de 60°C. La longitud de onda utilizada fue de 210 nm.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntesis de los hidrogeles. Se polimerizaron varias formulaciones, sin embargo en algunas de ellas se obtenían separación de fases. Las formulaciones en que no se presentó separación de fases y por lo tanto se obtuvieron hidrogeles homogéneos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de la mezcla de alimentación.

| Relación solvente/monómeros | | T ^a (°C) | Disolvente | Iniciador | Relación monómeros | | |
|-----------------------------|-------|---------------------|------------|-----------|--------------------|-------|-------|
| | | | | | 85/15 | 90/10 | 95/05 |
| NIPA/AI | 75/25 | 40 | Metanol | V-50 | I | no | x |
| | 82/18 | 25 | Agua | V-50 | II | x | x |
| AA/AI | 75/25 | 40 | Agua | V-50 | III | x | x |

3.2. Estudios de hinchamiento. En la Figura 1 se muestra, el grado de hinchamiento, H (%), en función del tiempo a pH 4,0 para los hidrogeles de los sistemas I, II y III con 1% de BIS, a una temperatura de $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. A pesar de que los tres sistemas; I, II y III, contienen ácido itacónico en su composición, tenemos una gran diferencia en el grado de hinchamiento de un hidrogel a otro. Los sistemas I y II que contienen NIPA, son los que presentan un mayor grado de hinchamiento en comparación con el hidrogel que contiene ácido acrílico (III). Este comportamiento se explica porque en estas condiciones, se está trabajando ligeramente por encima del primer pK del ácido itacónico (3,85) [6,7] y ligeramente abajo del pK del ácido acrílico (4,25). Por ello, tenemos un grado de disociación bajo, ya que la mayoría de los grupos carboxilos, no están ionizados. En esta figura se observa que el hidrogel sintetizado a 40°C utilizando como solvente metanol presenta una mayor absorción de agua que el hidrogel sintetizado a 25°C utilizando como solvente agua. Esto se debe a que el metanol es mejor disolvente de la NIPA que el agua y cuando se lleva a cabo la polimerización, el hidrogel que se forma tiene una estructura más abierta.

En la Figura 2, se muestra el grado de hinchamiento, H (%), en función del tiempo a pH 7,0, para los mismos sistemas I, II y III, a una temperatura de 37°C. A pH 7,0 se obtienen hinchamientos mayores debido a que a este pH los ácidos acrílico y ácido itacónico (segundo $pK = 5,45$) se encuentran completamente disociados, incrementándose la afinidad con el agua. En este pH, también los hidrogeles que contienen NIPA presentan un grado de hinchamiento mayor que aquellos sintetizados con ácido acrílico (AA) como comonomero. El hecho de que todos los sistemas que contienen NIPA absorban más cantidad de agua, puede explicarse si consideramos que existe un grado de entrecruzamiento más bajo debido a la menor reactividad del agente entrecruzante con la NIPA comparada con el AA.

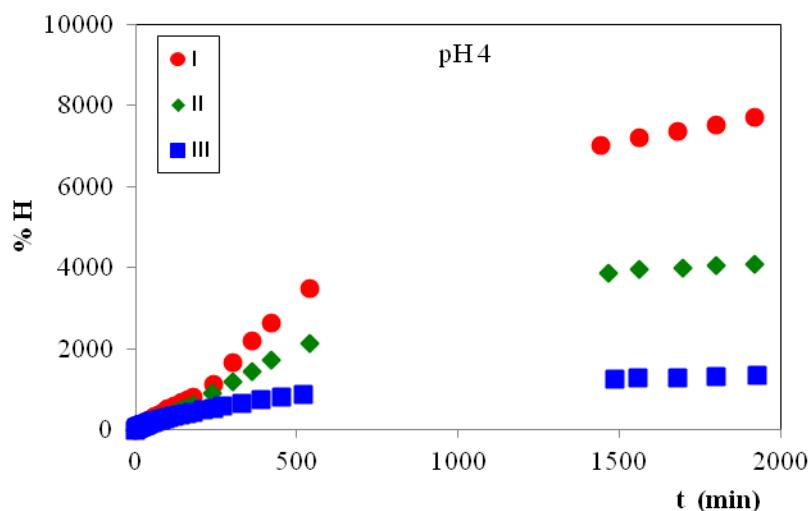


Figura 1. Grado de hinchamiento, H (%), en función del tiempo a pH 4, para los hidrogeles I, II y III; a una temperatura de $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

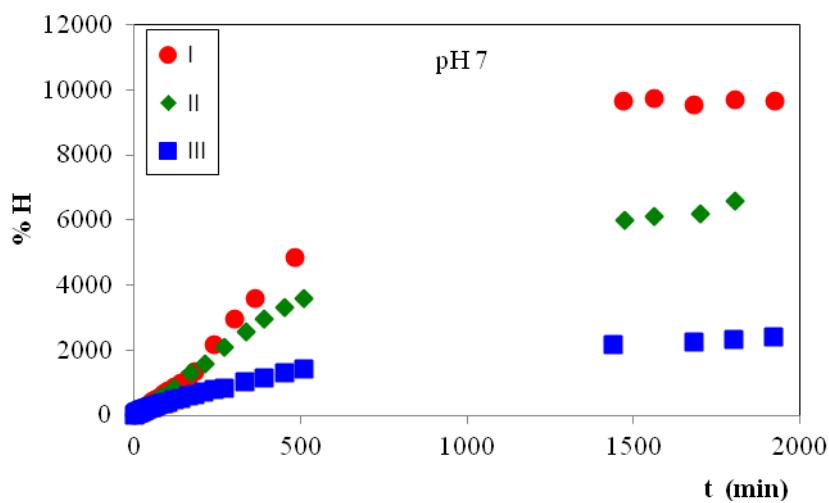


Figura 2. Grado de hinchamiento, H (%), en función del tiempo a pH 7, para los hidrogeles I, III y II; a una temperatura de $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

3.3. Incorporación del fármaco en el hidrogel. En la Figura 3 se puede ver el grado de hinchamiento (% H), en función del tiempo, de los hidrogeles del sistema I, en la mezcla de metanol/agua (MeOH/H₂O) 1:1 sin ciclosporina (CyA), y en disoluciones de diferente concentración de CyA, a una temperatura de 37 ± 0,1°C y un pH de alrededor de 7,0. Como se puede observar, A pesar de que hay variación importante en la cantidad de CyA absorbida tal como lo muestra la misma Tabla 2, se origina sólo una pequeña disminución en el grado de hinchamiento de los hidrogeles debido a la presencia del fármaco . Todas las cinéticas de hinchamiento en las diferentes disoluciones del fármaco, siguieron una cinética de segundo orden.

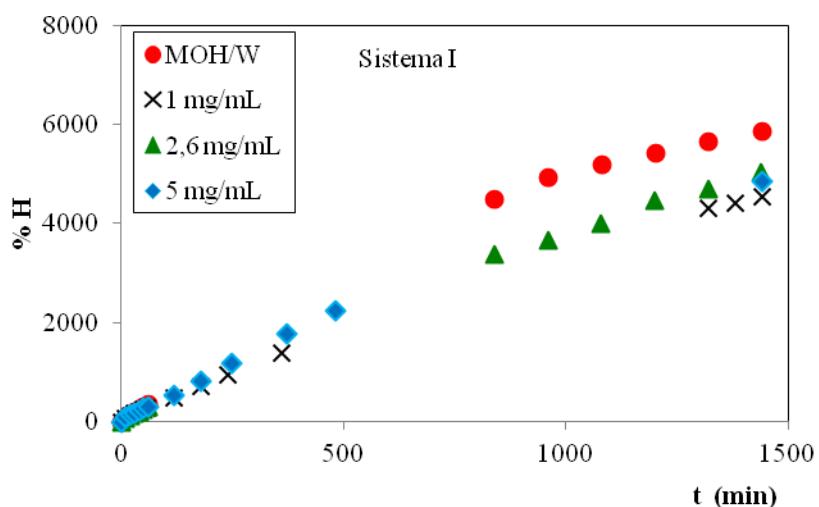


Figura 3. Grado de hinchamiento, % H, en función del tiempo, a) en mezcla de metanol/agua 1:1, b) en una solución de CyA de 1,0 mg·mL⁻¹, c) 2,6 mg·mL⁻¹ y d) 5,0 mg·mL⁻¹, para el sistema I; a una temperatura de 37 ± 0,1°C.

Tabla 2: Valores de ciclosporina cargada en los hidrogeles I y II.

| Sistema | % H | mg de ciclosporina por g de la solución de carga | mg CyA cargada por g de polímero |
|---------|-------|--|----------------------------------|
| I | 5.864 | 0,0 | — |
| | 4.551 | 1,0 | 45 |
| | 4.687 | 2,6 | 114 |
| | 4.857 | 5,0 | 244 |
| II | 4.590 | 0,0 | — |
| | 4.132 | 1,0 | 34 |

3.4. Estudios de liberación del fármaco. La cantidad de ciclosporina liberada como función del tiempo (t), se determinó a partir de varias curvas de calibración. La primera, se realizó con estándares conteniendo desde 0,4 ppm hasta 10,0 ppm de CyA, la segunda de 10,0 a 80,0 ppm y la última de 100 a 500 ppm.

La Tabla 3 muestra que la cantidad liberada de CyA por gramo de hidrogel depende de la forma de sintetizar el mismo, de su secado, de la cantidad de fármaco cargada y del pH del medio. Al aumentar la cantidad de ciclosporina en la solución utilizada para cargar los hidrogeles, la cantidad de CyA absorbida por el hidrogel se incrementa. Como se puede observar en la Tabla 3, a pH 1,6, se obtuvieron las menores concentraciones de carga y liberación de CyA debido a que los hidrogeles se hinchan poco a pH ácido, en cambio a un pH de 6,8 los grupos carboxilo se encuentran ionizados y por lo tanto, al aumentar la ionización se incrementan las repulsiones electrostáticas entre las cadenas poliméricas y el medio que lo rodea ocasionando un mayor grado de hinchamiento [8], lo cual permite que el fármaco se difunda con mayor facilidad a través del hidrogel

Tabla 3. Efecto del pH y tipo de hidrogel sobre la cantidad de ciclosporina cargada y posteriormente liberada.

| Identificación del sistema | [CyA] mg·g ⁻¹ | pH | mg de CyA cargada/g de polímero | mg de CyA liberada/g de polímero | ppm de CyA liberada en la solución |
|----------------------------|--------------------------|-----|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| I | 1,0 | 1,6 | 45 | 5,90 | 12,59 |
| | | 4,5 | 45 | 10,8 | 22,41 |
| | | 6,8 | 45 | 18,0 | 38,57 |
| | 2,6 | 1,6 | 114 | 35,9 | 73,57 |
| | | 4,5 | 114 | 75,6 | 143,8 |
| | | 6,8 | 114 | 68,3 | 147,8 |
| | 5,0 | 1,6 | 244 | 10,9 | 19,79 |
| | | 4,5 | 244 | 28,2 | 54,16 |
| | | 6,8 | 244 | 150 | 248,4 |
| II | 1,0 | 1,6 | 34 | 2,80 | 3,500 |
| | | 4,5 | 34 | 4,90 | 7,160 |
| | | 6,8 | 34 | 5,90 | 7,660 |

La Figura 5 muestra que al aumentar el pH la velocidad de liberación y la cantidad liberada se incrementa, similares resultados se obtuvieron con los otros hidrogeles.

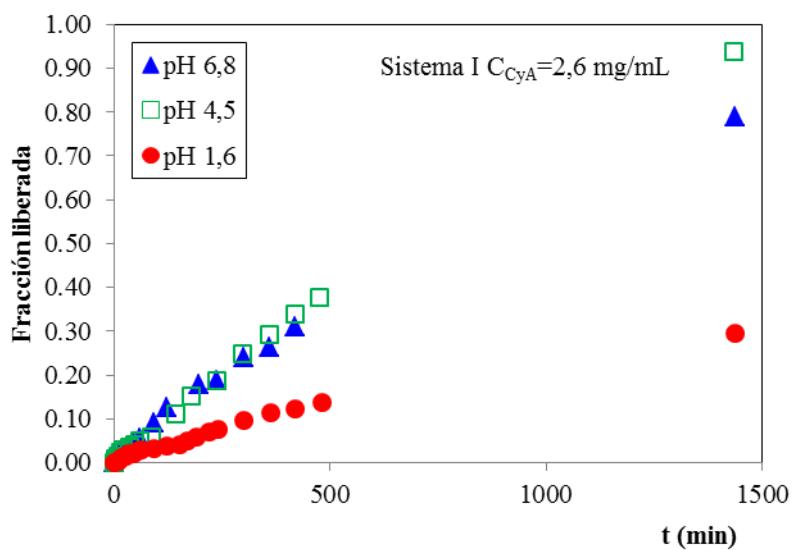


Figura 5. Fracción de ciclosporina liberada en función del tiempo, del sistema I en diferentes pH (1,6, 4,5 y 6,8); a una temperatura de $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Tabla 4. Valores de n , D_i y el coeficiente de linealidad de las cinéticas de liberación de ciclosporina en los hidrogeles de los sistemas I y II.

| Identificación del sistema | Conc. CyA $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ | pH | n | $D_i \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ | r |
|----------------------------|--|-----|-------|---|-------|
| I | 1,0 | 1,6 | 0,615 | 7,425 | 0,999 |
| | 2,6 | | 0,838 | 0,923 | 0,989 |
| | 5,0 | | 0,796 | 0,123 | 0,999 |
| | 1,0 | 4,5 | 0,589 | 7,988 | 0,999 |
| | 2,6 | | 0,910 | 1,531 | 0,998 |
| | 5,0 | | 0,784 | 0,384 | 0,998 |
| | 1,0 | 6,8 | 0,485 | 38,634 | 0,998 |
| | 2,6 | | 0,756 | 5,919 | 0,979 |
| | 5,0 | | 0,703 | 1,229 | 0,998 |
| II | 1,0 | 1,6 | 0,928 | 0,02 | 0,99 |
| | | 4,5 | 0,676 | 2,39 | 0,99 |
| | | 6,8 | 0,540 | 11,8 | 0,99 |

De las cinéticas de liberación estudiadas para los sistemas I y II, se obtuvieron los coeficientes de difusión (D_i) así como el exponente difusional, n . Como se puede observar en la Tabla 4 la mayoría de los valores de n son mayores a 0,5. Esto nos indica, que el mecanismo de liberación de la ciclosporina en estos hidrogeles no cumple la ley de *Fick*; el mecanismo de difusión es de tipo no fickiano o anómala, demostrando que el proceso está controlado parcialmente por la relajación viscoelástica de la matriz, es decir, por procesos de hinchamiento y difusión [7–9]. También se puede observar que a medida que se aumenta el pH, la liberación se acerca más a la liberación tipo fickiana. Esto se explica porque a medida que el pH se incrementa, el hidrogel se hincha más y más rápido por lo que la relajación ocurre más rápido [8,10–13].

Los valores de la constante de difusión a los tres diferentes pH (véase Tabla 4) nos muestran que a pH 1,6, tenemos el menor valor de D_i . Esto se debe, a que a ese pH los grupos carboxilos no se encuentran ionizados y por lo tanto el hidrogel casi no presenta incremento de volumen dificultando la difusión del fármaco a través de él. A pH mayores que el pK_a del ácido itacónico, el hidrogel se hincha más, y por eso, el coeficiente de difusión es mayor a pH 6,8. Como se explicó en el párrafo anterior, a pH bajo, el hidrogel no se hincha tanto y el proceso de liberación es controlado por la relajación [9]

Los valores de los coeficientes de difusión de la ciclosporina liberada para el sistema I fueron más bajos, que los obtenidos por *Tasdelen* para liberar 5-fluorouracil (5-FU), a partir de hidrogeles de poli(NIPA/AI), con valores del coeficiente de difusión de aproximadamente $3,2$ a $12,9 \cdot 10^{-8}$ [13]. Esto se debe a que el 5-FU es un fármaco de tamaño pequeño (bajo peso molecular, 130,0 gr/mol), lo cual permite difundir más fácilmente a través de la matriz polimérica, y la CyA es un fármaco de elevado peso molecular (peso molecular, 1.202,6 g/mol).

4. CONCLUSIONES

Los hidrogeles de los sistemas que contienen NIPA (I y II) en su composición, son los que presentan una mayor velocidad de hinchamiento y mayor grado de absorción de agua.

Aunque no existe gran diferencia en el grado de hinchamiento de los hidrogeles de los sistemas estudiados, en soluciones de CyA, si se observa variación notoria en la cantidad de CyA absorbida, debido principalmente, a la diferencia de las concentraciones de las soluciones con las que fueron cargados los hidrogeles.

El proceso de hinchamiento de todos los hidrogeles se ajusta a una cinética de segundo orden.

La cantidad de CYA liberada se incrementa con el pH.

El mecanismo de liberación de la ciclosporina en estos hidrogeles es de tipo no-fickiano o anómalo y sólo a pH de 6,5 se aproxima al mecanismo fickiano.

El coeficiente aparente de difusión aumenta a medida que aumenta el pH.

Agradecimientos. Se agradece el apoyo recibido por CONACYT por la beca otorgada a *Judith Cornejo*.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sáez V, Hernáz E, López L “Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas”. *Rev. Iberoam. Polím.*, **4**, 2 (2003)
- [2] Kim SW, Bae YH, Okano T, *J. Pharm. Res.*, **9**, 283 (1992)
- [3] Vakkalanka SK, Brazel CS, Peppas NA, *J. Biomater. Sci. Polym.*, **8**, 119 (1996)
- [4] Stevin G, *Permeability and Applications of Environmentally Responsive Gels*, **110**, 85 (1993)
- [5] Caykara T, Kiper S, *Eur. Polymer J.*, **42**, 348 (2006)
- [6] Katchalsky A, Spitzik P, *J. Polym. Sci.*, **2**, 432 (1947)
- [7] Valderruten N, Tesis Doctoral, Universidad del País Vasco, (2000)
- [8] Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H, *Eur. J. Pharm. & Biopharm.*, **50**, 27 (2000)
- [9] Díez PE, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid “Desarrollo y caracterización de hidrogeles poliméricos con aplicación en la liberación controlada de fármacos”, Madrid 2002.
- [10] Escobar JL, García DM, Valerino A, Zaldivar D, Katime I, *Rev. Iberoam. Polím.*, **3**, 1 (2001)
- [11] Katime I, Katime O, Katime D “Los materiales inteligentes de este milenio: Los hidrogeles macromoleculares síntesis, propiedades y aplicaciones”, Editorial de la Universidad del País Vasco, Bilbao 2003
- [12] Peppas NA, Gurny R, *Pharm. Acta Helv.*, **58**, 2 (1983)
- [13] Tasdelen B, Kayaman-Apohan N, Güven O, Baysal BM, *Radiation Physics & Chemistry*, **73**, 340 (2005)