

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**



TESIS

**“COPOLIMEROS DE NIPAAM CON AJUSTE DE LA
LCST PARA LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

GABRIELA BELTRÁN LARA

TIJUANA B.C.

AGOSTO DEL 2007

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
E INGENIERÍA

FOLIO No. **236**

Tijuana, B.C.

C. GABRIELA BELTRÁN LARA

05 DE JUNIO DE 2007.

Pasante de QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la

Opción TESIS

es propuesto, por el C. DR. JOSE MANUEL CORNEJO BRAVO

quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al tema
COPOLIMEROS DE NIPAAM CON AJUSTE DE LA LCST PARA LA LIBERACIÓN DE
FÁRMACOS

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- EXPERIMENTAL
- III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- IV.- CONCLUSIONES
- V.- REFERENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA

M.C. RUBÉN GUILLERMO SEPÚLVEDA
MARQUÉS
Sub-Director Secretario

DR. JOSÉ MANUEL CORNEJO BRAVO

Asesor

MC. MARÍA EUGENIA PÉREZ MORALES

Directora

CONTENIDO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	vii
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCION.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	2
1.2 OBJETIVOS.....	12
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	12
II. EXPERIMENTAL.....	14
2.1 MATERIALES Y EQUIPO.....	15
2.2 REACTIVOS.....	16
2.3 EFECTO DEL pH EN EL HINCHAMIENTO AL EQUILIBRIO.....	17
2.4 CARGADO DE LOS GELES.....	18
2.5 LIBERACIÓN CONTROLADA DEL FÁRMACO.....	18
2.6 LIBERACIÓN PULSATIL DEL FÁRMACO.....	19
2.7 LIBERACION ESPECÍFICA DE SITIO CONTROLADA POR EL pH.....	20
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
3.1 EFECTO DEL pH EN EL HINCHAMIENTO AL EQUILIBRIO.....	23
3.2 LIBERACIÓN CONTROLADA DEL FÁRMACO.....	24
3.3 LIBERACIÓN PULSATIL DEL FÁRMACO.....	25
3.4 LIBERACION ESPECÍFICA DE SITIO CONTROLADA POR EL pH.....	29
IV. CONCLUSIONES.....	31
REFERENCIAS.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

g	gramos
h	hora
LCST	temperatura crítica inferior de disolución (por sus siglas en Inglés)
M	molar
min	minutos
ml	mililitros
NIPAAm	N-isopropilacrilamida
PNIPAAm	Poli-N-isopropilacrilamida
Q	grado de hinchamiento
rpm	revoluciones por minuto
T	temperatura
t	tiempo
MK4	ácido metacrioloiloxipentanoico, sal de potasio
MK7	ácido metacrioloiloxioctanoico, sal de potasio
MK10	ácido metacrioloiloxiundecanoico, sal de potasio
Px-y	gel que contiene el monómero con x metilenos en un y % (molar)
MAA	ácido metacrílico
APS	persulfato de amonio
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina
BIS	etilenbisacrilamida
LH	hormona luteinizante
TGI	tracto gastrointestinal

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. N-isopropilacrilamida (NIPAAm).
- Figura 2. Copolímeros de NIPAAm con metacrilatos de carboxialquilo.
- Figura 3. a) Q en el equilibrio con respecto a la T de las diferentes especies de hidrogeles a) pH 1.2 b) a pH 7.4.
- Figura 4. Cinética de liberación de ácido salicílico a 25 y 37°C en dos medios diferentes pH 1.2 y pH 7.4, hidrogel P4-10.
- Figura 5. Cinética de liberación de ácido salicílico a 25 y 37°C en dos medios diferentes pH 1.2 y pH 7.4, hidrogel P10-05.
- Figura 6. a) Baño con control de T y rpm. b) Vasos con los distintos hidrogeles.
- Figura 7. Recirculadores de agua para mantenimiento de T.
- Figura 8. Espectrofotómetro UV/VIS Beckman Coulter®.
- Figura 9. Q con respecto al pH de las diferentes especies de hidrogeles.
- Figura 10. Liberación controlada de indometacina de dos distintas especies de hidrogeles a T= 25°C y 37°C y pH= 1.2 y 7.4.
- Figura 11. Q del hidrogel P04-10 a 25°C y 37°C durante 3 ciclos.
- Figura 12. Q del hidrogel P07-05 a 25°C y 37°C durante 3 ciclos.
- Figura 13. Q del hidrogel P10-05 a 25°C y 37°C durante 3 ciclos.
- Figura 14. Velocidad de liberación pulsátil del hidrogel P04-10 durante tres ciclos a 25°C y 37°C.
- Figura 15. Velocidad de liberación pulsátil del hidrogel P07-05 durante tres ciclos a 25°C y 37°C.
- Figura 16. Velocidad de liberación pulsátil del hidrogel P10-05 durante tres ciclos a 25°C y 37°C.
- Figura 17. Fracción liberada de indometacina del hidrogel P04-10 durante tres ciclos a 25°C y 37°C.
- Figura 18. Fracción liberada de indometacina del hidrogel P07-05 durante tres ciclos a 25°C y 37°C.
- Figura 19. Fracción liberada de indometacina del hidrogel P10-05 durante tres ciclos a 25°C y 37°C.

Figura 20. Liberación controlada del hidrogel P10-05 a pH= 8.

Figura 21. Liberación controlada del hidrogel P4-10 a pH= 1.2.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Notación para los hidrogeles sintetizados.

Tabla 2. Cantidad de reactivos utilizados en la preparación de los hidrogeles.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biofarmacia de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, bajo la dirección del **Dr. José Manuel Cornejo Bravo**, con el apoyo de los Fondos Sectoriales SEP-CONACyT para la investigación básica (CONACyT-2002-C-01-40262) y el fondo SALUD-CONACYT (SALUD-2002-C01-40262).

Agradecimientos:

*A mi madre por darme su apoyo y amor incondicional
todos los días de mi vida...*

*A mis amigos por toda la paciencia y comprensión que
mostraron hacia mi persona durante la realización de este
trabajo; ellos son indiscutiblemente parte de mi y se han
convertido en la familia que yo elegí...*

*Al Dr. José Manuel Cornejo Bravo, porque además de
ser un guía en esta aventura se ha convertido en un gran
amigo.*

*Y principalmente a Dios, porque sin su voluntad nada
hubiese sido posible.*

RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron hidrogeles a base de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) conteniendo metacrilatos de carboxialquilo con tres longitudes diferentes en su cadena alifática ($n= 4, 7$ y 10) y dos concentraciones molares de los mismos (5 y 10%); los cuales debido a las características termosensibles de la NIPAAm y el contenido de grupos ácido carboxílico (ionizables) sufren una transición en el grado de hinchamiento en respuesta a cambios en el pH y la Temperatura. La temperatura crítica de disolución inferior (LCST) depende del tipo y la proporción de metacrilato de carboxialquilo en el copolímero, y del pH del medio.

A los geles se les realizaron pruebas del hinchamiento en el equilibrio con respecto al pH a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, encontrándose que el pH de transición depende de la composición del copolímero. Cuando se utiliza el monómero con $n=4$, el pH de transición disminuye en la medida que se incrementa la proporción de monómero ácido, indicando que el carácter hidrofílico producido por el ión carboxilato prevalece sobre la cadena hidrofóbica. Caso contrario, cuando $n=10$ el carácter hidrofóbico de la cadena alifática prevalece sobre el grupo ionizado y el pH de transición se incrementa.

Los geles se cargaron con el fármaco modelo indometacina. Los estudios de liberación demostraron que se tiene una liberación sostenida en las condiciones en las que los geles se hinchan y que no existe liberación en las condiciones en las que los geles permanecen colapsados. Se concluye que estos geles pueden utilizarse para liberación de fármacos controlada por el pH. Estudios con ciclos de temperatura por abajo y por arriba de la LCST demostraron que es posible obtener liberación pulsátil con estos geles, aunque la liberación resultó errática.

I. INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

El mejoramiento continuo, la búsqueda acelerada y el desarrollo de materiales poliméricos han jugado un papel vital en el progreso de la mayoría de las tecnologías de liberación controlada. En los últimos 25 años, ha habido un considerable incremento en el interés de esta tecnología, mostrado por el incremento de publicaciones y patentes en el área de liberación controlada de fármacos usando tanto materiales sintéticos como también materiales poliméricos naturales.¹

Los hidrogeles son redes hidrofílicas de polímeros que pueden absorber desde 10% hasta miles de veces su peso seco en agua.² En general, los hidrogeles poliméricos tienen muchas características que los hacen ideales para aplicaciones biomédicas. Adicionalmente, los hidrogeles sensibles a condiciones ambientales son capaces de la liberación de medicamentos de una forma controlada (bajo condiciones fisiológicas) como ocurre en un estado patológico. Debido a la capacidad de liberar pequeñas cantidades de fármaco directo al área afectada, pueden ser usados para incrementar la efectividad de la farmacoterapia y reducir los costos de los tratamientos médicos.³

En las últimas décadas se han desarrollado polímeros que responden con cambios en alguna propiedad (fase, forma, propiedades ópticas o mecánicas, velocidad de permeación, etc.), a estímulos externos ya sean físicos o químicos como pH, temperatura, campo eléctrico, iones, luz visible o UV, disolventes, reactantes, etc. A este tipo de materiales se les llamó "polímeros inteligentes". Recientemente se han sintetizado diferentes tipos de hidrogeles sensibles a los cambios de temperatura y pH, los cuales han sido utilizados en diferentes áreas como: la agricultura, horticultura, comunicaciones, industrial (sellantes, desecantes) y en el área biomédica como biosensores, músculos artificiales, ingeniería de tejidos y como sistemas de liberación

de fármacos, por su capacidad de liberarlos a una velocidad constante por un largo período de tiempo (cinética de orden cero),⁴ llevándose a cabo gracias al hinchamiento que presentan los geles, ya que por ser hidrofílicos absorben grandes cantidades de agua y/o cuando factores como la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la concentración de la solución, etc., detonan la liberación del fármaco dando como resultado una liberación sensible.

No todos los agentes terapéuticos necesitan ser liberados a una velocidad constante. Por el contrario, es esencial liberar fármacos de una manera apropiada e ideal, respondiendo a las necesidades de los mismos. Las características específicas para la liberación controlada pueden prolongar y retener la liberación de fármacos que se caracterizan por poseer una rápida metabolización, permitiendo así dosis más efectivas. Estos sistemas también pueden proteger a fármacos bioactivos sensibles (como lo son las proteínas) hasta el blanco específico en donde necesitan ser entregados, además, la administración de grandes cantidades de compuestos bioactivos pueden causar algunos efectos secundarios indeseables, los cuales pueden ser minimizados con el uso de un sistema de liberación regulado. Los sistemas de liberación controlada han sido utilizados para alcanzar tanto modelos de orden cero como de liberación pulsátil.³

La liberación pulsátil o pulsada de fármacos se define como la liberación rápida y transitoria de una cantidad concreta de moléculas de un fármaco dentro de una cantidad corta de tiempo inmediatamente después de un predeterminado periodo de cese en la liberación.⁵ En la liberación pulsátil es importante no solo que el hinchamiento y colapso de los hidrogeles sea dependiente de las condiciones ambientales (como pH y temperatura), sino que el tamaño de la red tridimensional del mismo hidrogel sea reversiblemente y capaz de atrapar y prevenir la difusión del fármaco.³ Los laboratorios Ferring han introducido un sistema de liberación pulsátil portátil llamado Pulsamat, el

cual se utiliza para la liberación de la hormona luteinizante (LH). La liberación pulsátil de LH ha ayudado a inducir la ovulación en mujeres fértiles.¹

Uno de los materiales poliméricos mas estudiados para la liberación de fármacos en respuesta a estímulos es la N-isopropilacrilamida (NIPAAm) (**Figura 1**). La síntesis de NIPAAm se ha realizado mediante técnicas como la iniciación por radicales libres en disoluciones orgánicas y la iniciación redox en medios acuosos.⁴

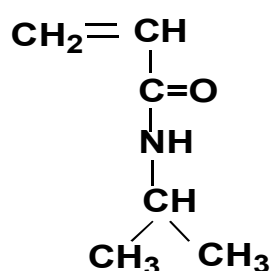


Figura 1. N-isopropilacrilamida (NIPAAm)

PNIPPAAm es una clase de polímero que presenta un comportamiento específico debido LCST. Los geles entrecruzados de NIPPAm han mostrado termorespuesta, fases discontinuas de hinchamiento/colapso, por ejemplo, a temperaturas por debajo de 32 °C se encuentran hinchados, mientras que se colapsan (encogen) por encima de esta temperatura. Un repentino incremento por arriba de la temperatura de transición de estos geles da como resultado la formación de una superficie densa y colapsada o “piel” la cual obstaculiza el paso del agua del gel hacia el exterior.⁵ Debido a que el LCST de NIPAAm es de 32 °C, este polímero tiene un potencial como sensor en humanos, así como en procesos de separación que involucran materiales que pueden ser desnaturalizados a altas temperaturas. NIPPAm tiene el mayor hinchamiento de transición repentino de los polímeros de alquil acrilamida

termosensibles, diferenciándolo como extremadamente sensible a pequeños cambios en la temperatura.

Brazel y Peppas² estudiaron dos clases de polímeros: NIPPAm y MAA. Los polímeros de MAA son ideales por su sensibilidad ante el pH. Estos se hinchan hasta 10 veces su peso seco en soluciones básicas y se colapsan en soluciones ácidas. Este comportamiento se debe a la repulsión electrostática entre la cadena de ácido carboxílico y los iones presentes en la solución amortiguadora. A valores de pH altos, las cadenas que contienen el carboxilato son repelidas por los aniones en la solución, y minimizan las cargas por expansión. Una vez que se sintetizaron hidrogeles de manera conjunta, se llevó a cabo liberación en condiciones pulsátiles de agentes trombóticos y antitrombóticos como la estreptoquinasa y heparina, respectivamente. El espacio disponible para difusión entre la red de los hidrogeles presentó una diferencia muy notoria entre hinchado y colapsado, mostrado así en la liberación pulsátil de la estreptoquinasa, respondiendo a pequeños cambios de pH y temperatura. Cuando el cambio de pH y temperatura se realizó de manera simultánea, la proporción de hinchamiento fue mucho más rápida y mejor comparada con el cambio mostrado cuando solamente una de las dos condiciones fue manipulada. A pesar de que la liberación de los dos agentes fue completa, el control de la liberación de la estreptoquinasa fue mucho más efectivo que el de heparina debido a las diferencias del tamaño molecular (molecularmente la heparina es más pequeña), pero debido a la polidispersión de la heparina, las cadenas más largas de esta quedaron atrapadas dentro del hidrogel hasta que se alcanzó un estado de hinchamiento mayor del mismo. De cualquier manera la formación de la “piel” en la periferia y los movimientos propios del hinchamiento y colapso del hidrogel se mostraron solamente en aquellos que contienen un 98% de NIPPAm o más, mientras que los polímeros utilizados en este trabajo

contenían por lo menos un 12% de MAA, lo cual los hacía más hidrofílicos por lo que se dificultó el control de la liberación, específicamente la liberación de heparina.³

Guerrero et al.,⁴ se utilizaron copolímeros de NIPPAAm con metacrilatos de carboxialquilo (**Figura 2**) que tienen un carácter hidrofóbico dado por la longitud de la cadena alifática del monómero ($n = 4, 7$ y 10), para obtener un material hidrofóbico sensible al pH



Figura 2. Copolímeros de NIPPAAm con metacrilatos de carboxialquilo.

Ellos sintetizaron hidrogeles sensibles a la temperatura y al pH, copolimerizando ácido metacriloiloxipentanoico, ácido metacriloiloxioctanoico y ácido metacriloiloxiondecanoico en forma de sal de potasio (M4K, M7K y M10K) y NIPAAm con una técnica reportada. (**Tabla 1**). Estos materiales por la naturaleza del comportamiento de la NIPAAm ante los cambios de temperatura y los grupos ácidos ionizables presentes en los metacrilatos de carboxialquilo que componen la red del polímero, tendrán la característica de ser hidrogeles inteligentes bidimensionales.

Tabla 1. Notación para los hidrogeles sintetizados

Composición molar	Hidrogeles preparados
100% NIPAAm	PN100
5% M4K, 95% NIPAAm	P4-05
10% M4K, 90% NIPAAm	P4-10
5% M7K, 95% NIPAAm	P7-05
10% M7K, 90% NIPAAm	P7-10
5% M10K, 95% NIPAAm	P10-05
10% M10K, 90% NIPAAm	P10-10

Prepararon un hidrogel conteniendo 100% de NIPAAm y seis hidrogeles diferentes a base de NIPAAm, variando el contenido molar en un 5% y 10% para el comonomero M4K, M7K y M10K (**Tabla 2**).

Tabla 2. Cantidad de reactivos utilizados en la preparación de los hidrogeles

Hidrogel	NIPAAm (g)	M4K (g)	M7K (g)	M10K (g)	Agua desionizada (mL)	BIS (g)	Sol. APS 0.15 M (mL)	Sol. TEMED 0.15 M (mL)
PN100	1.7652	0	0	0	7.9207	0.0721	1.0397	1.0397
P4-05	1.6765	0.1748	0	0	7.9207	0.0721	1.0397	1.0397
P4-10	1.5882	0.3496	0	0	7.9207	0.0721	1.0397	1.0397
P7-05	1.6765	0	0.2075	0	7.9207	0.0721	1.0397	1.0397
P7-10	1.5882	0	0.415	0	7.9207	0.0721	1.0397	1.0397
P10-05	1.6765	0	0	0.2405	7.9207	0.0721	1.0397	1.0397
P10-10	1.5882	0	0	0.4806	7.9207	0.0721	1.0397	1.0397

En el mencionado trabajo previo⁴ se estudió el grado de hinchamiento (Q) con respecto a dos distintos medios: pH 1.2 y 7.4. En el primer caso se observó que la LCST de los hidrogeles se encontró por debajo de los 25 °C, mientras que en el segundo pH la LCST observada fue de 32 °C, ya que la ionización de los grupos carboxílicos son

suficientes para vencer las fuerzas hidrofóbicas de la NIPAAm, caso contrario del pH 1.2. Aunado a esto, la longitud de la cadena hidrofóbica de los metacrilatos influye en Q. A menor longitud de la cadena hidrofóbica del metacrilato el aumento de la LCST es mayor (Figura 3).

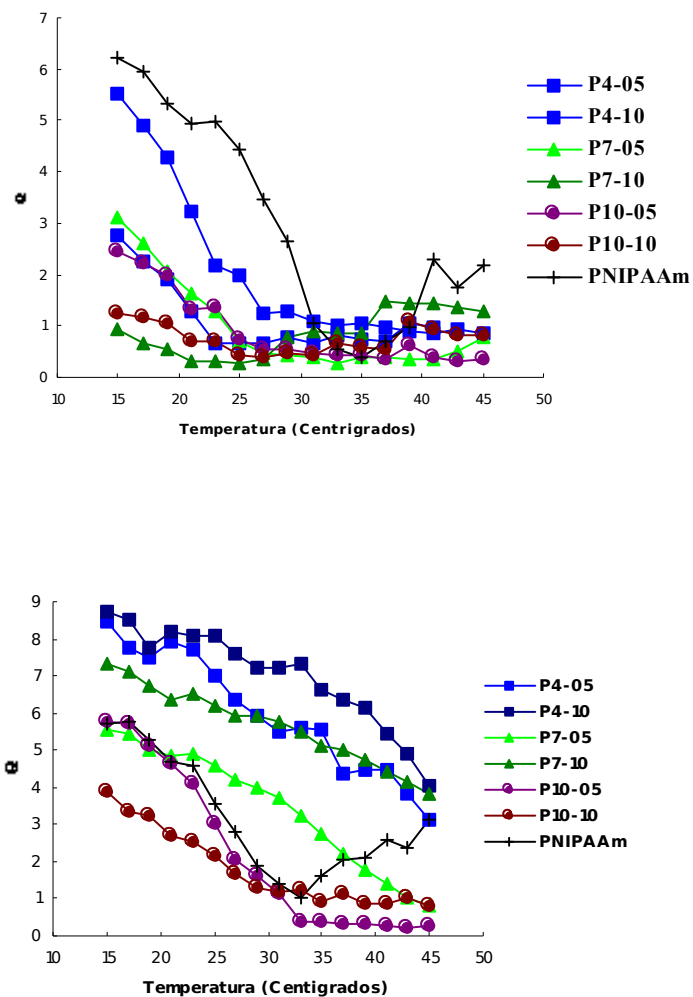


Figura 3. Q en el equilibrio con respecto a la T de las diferentes especies de hidrogeles a) pH 1.2 y b) a pH 7.4.

Se realizaron además estudios de liberación controlada con los geles P4-10 y P-10-05, utilizando ácido salicílico como fármaco modelo, donde se pudo observar que para el hidrogel P4-10 la liberación fue rápida en el medio básico, completándose en un intervalo de 8 h, cuando se exponen al medio ácido la liberación es mínima ya que el hidrogel se encuentra contraído impidiendo la liberación del fármaco. **(Figura 4)**. Para el hidrogel P10-05 se liberó una cantidad mínima en el medio gástrico y en el medio intestinal la liberación es considerable y se ve influenciada por la temperatura; si está debajo de su LCST la liberación es sostenida, ya que la red del polímero se expande. Cuando la temperatura del medio es aumentada por arriba de su LCST el hidrogel se contrae resultando que la liberación sea mínima **(Figura 5)**.

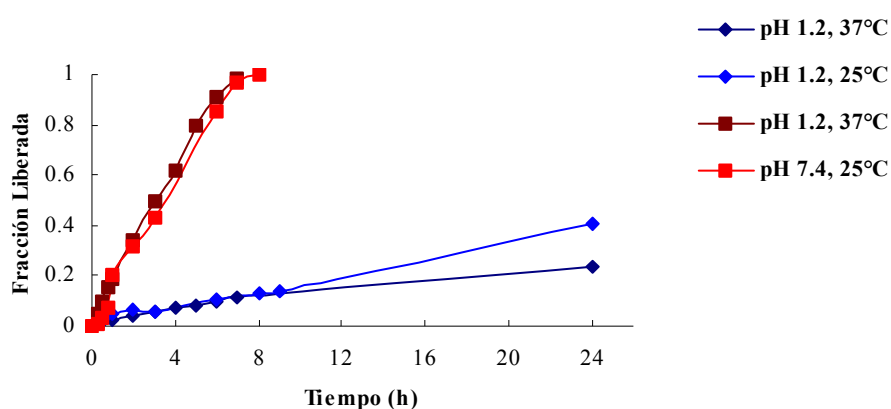


Figura 4. Cinética de liberación de ácido salicílico a 25 y 37 °C en dos medios de diferentes pH: 1.2 y 7.4, para el hidrogel C04-10.

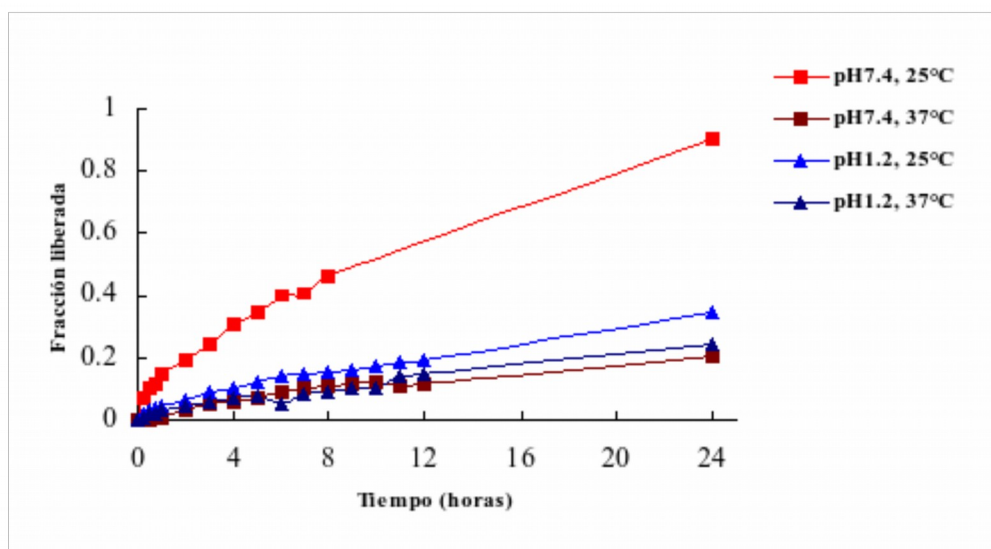


Figura 5. Cinética de liberación de ácido salicílico a 25 y 37°C en dos medios de diferentes pH: 1.2 y 7.4, para el hidrogel C10-05.

Otra área de suma importancia sobre la liberación a pH y sitio específico son los sistemas de entrega en colon. Aunque la ingesta oral de fármacos ha sido aceptada como la vía de administración tradicional, el tracto gastrointestinal presenta múltiples sitios para la absorción de fármacos. La entrega de estos de manera directa en el colon ha incrementado su importancia no solo para el tratamiento de enfermedades locales asociadas con el colon, sino también por su potencial para la entrega de proteínas y péptidos terapéuticos.

Para alcanzar una liberación adecuada en colon, un fármaco necesita estar protegido de absorción y/o el medio ambiente del TGI alto y por consiguiente ser abruptamente liberado dentro de la porción proximal del colon, donde es considerado el sitio óptimo para que se lleve a cabo dicha entrega.

La liberación de fármacos directa en el colon está considerada para enfermedades específicas del mismo tales como: la enfermedad de Chron, colitis

ulcerosa, cáncer colorectal y amebiasis. Péptidos, proteínas y oligonucleótidos son los candidatos para este tipo de liberación. Los sistemas de entrega mejorados tecnológicamente son requeridos para fármacos que se utilizan para tratar enfermedades propias del colon. Los avances sobre fármacos que llegan directo al sitio diana (específicamente a colon enfermo) reducen la incidencia de reacciones adversas sistémicas, menor dosis del fármaco, administración del fármaco a la biofase solo cuando es requerido y mantenimiento del fármaco en su forma intacta tanto como sea posible al sitio específico.⁶

En el siglo XVIII un farmacéutico francés llamado Baume, introdujo mantequilla de cocoa como vehículo para la preparación de supositorios, gracias a esto se logró un avance en el uso de la vía rectal para la administración de fármacos. Además de estos existen actualmente otros vehículos para la entrega de fármacos. La administración rectal puede ser utilizada tanto para efectos locales como para efectos sistémicos. Dependiendo de la naturaleza del vehículo y del fármaco, están involucrados distintos mecanismos de liberación, los cuales dependen tanto de la solubilidad del fármaco (como indometacina, que tienen baja solubilidad en agua y alta solubilidad en grasa) como de la ionización del mismo, esta a su vez dependiente del pH, que en el caso del colon radica entre un 7.5 a 8.0.¹

La indometacina (**Figura 6**) es un fármaco no esteroideo con propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas. No es un analgésico simple, y, debido a sus posibles reacciones adversas, no debe utilizarse para problemas triviales o menores. Esta indicada para el tratamiento de artritis reumatoidea, espondilitis anquilosante (reumatoidea), artrosis, bursitis, tendinitis, artritis gotosa y conducto arterioso persistente en prematuros. Se absorbe rápidamente después de la administración oral; los niveles plasmáticos máximos se alcanzan en 2 horas; el 97% del fármaco se une a

las proteínas. Su vida media es de 2.6 a 11.2 horas; del 10 al 20% del fármaco se excreta sin alteraciones por orina. Como es un fármaco potente y puede causar efectos adversos severos, debe considerarse cuidadosamente para el tratamiento de una enfermedad activa que no responde a un ensayo adecuado con salicilatos y otras medidas convencionales, como el reposo adecuado. Esta contraindicada en niños, embarazo, problemas gastrointestinales e individuos alérgicos a la aspirina.⁷

1.2 OBJETIVOS

Generales:

Utilizar hidrogeles sensibles a la temperatura y al pH a base de NIPAAm copolimerizados con metacrilatos de carboxialquilo con cadenas hidrofóbicas de diferentes longitudes para la realización estudios de liberación controlada sensible al pH de indometacina y estudios de liberación pulsátil controlada por la temperatura.

Específicos

1. Evaluar el comportamiento de hinchamiento de los geles con respecto al pH.
2. Estudiar el efecto de la composición (comonomero y proporción) en la cinéticas de liberación de indometacina controlada por el pH.
3. Realizar estudios de liberación pulsátil controlados por la temperatura de los geles bajo estudio. Estudiar el efecto de la composición.

1.3 JUSTIFICACIÓN

En el presente trabajo se sintetizaron los hidrogeles copolimerizando NIPPAm junto con metacrilatos de carboxialquilo. De esta forma se introducirá sensibilidad al pH al material. El carácter hidrofóbico de los monómeros ácidos permitirá mantener la hidrofobicidad del material y por lo tanto mantener la LCST cerca de la temperatura

corporal. De igual manera se espera que la transición de hinchamiento se mantenga, esto es que la diferencia en Q entre el estado hinchado y colapsado sea suficiente para controlar la liberación de fármacos. Con dichos materiales se pueden obtener sistemas de liberación de fármacos sensibles al pH y por tanto con aplicación en la liberación específica de sitio en el tracto gastrointestinal. Por otro lado la sensibilidad a la temperatura permite la liberación de fármacos de manera pulsátil, lo cual puede ser de beneficio para la farmacoterapia. Se eligió a la indometacina como fármaco modelo ya que es un fármaco muy poco soluble en agua y por tanto es un fármaco que presenta problemas para su formulación y baja biodisponibilidad. Por otra parte al ser un antipirético es interesante estudiar si el control de la fiebre puede controlar la liberación del fármaco.

II.

EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAL Y EQUIPO

Agitador magnético

Agitadores DYLASTIR[®] VWR

Balanza analítica DENVER INSTRUMENT

Baño a temperatura controlada VWR[®]

Bomba para vacío

Espectrofotómetro DU[®]520 BECKMAN COULTER

Estufa para vacío VWR[®]

Papel filtro 1 WHATMAN[®]

Papel PARAFILM[®]

Potenciómetro CORNING INC.

Recirculador de temperatura constante COLE PALMER[®]

Recirculador de temperatura constante LAUDA BRINKMANN[®]

Ultrasonido

Vaso con chaqueta de 1000ml KONTES

Vaso de precipitado de 250 ml

2.2 REACTIVOS

ALDRICH grado USP:

Indometacina

FERMONT grado reactivo:

Ácido clorhídrico

Fosfato monobásico de potasio

LABGUARD grado reactivo:

Cloruro de sodio

SPECTRUM grado reactivo:

Metanol

Etanol

TCI-EP grado reactivo:

N-isopropilacrilamida

Hidróxido de sodio

Agua desionizada

Monómeros obtenidos según técnica previamente reportada.⁹

Ácido metacrioloiloxipentanoico, sal de potasio (M4K)

Ácido metacrioloiloxioctanoico, sal de potasio (M7K)

Ácido metacrioloiloxiundecanoico, sal de potasio (M10K)

2.3 EFECTO DEL pH EN EL HINCHAMIENTO EN EL EQUILIBRIO

Se realizaron pruebas para evaluar la cinética de hinchamiento de los hidrogeles preparados con anterioridad: PN100, P4-05, P4-10, P7-05, P7-10, P10-05 y P10-10; lo anterior respecto al pH. Se prepararon medios fisiológicos simulados con metodología ya reportada⁸, donde los valores de pH estudiados fueron: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11. Se utilizó el baño con agitación con temperatura controlada a (37°C y 50 rpm), colocándose un hidrogel por especie (previamente pesados en seco) en vasos de precipitado de 250 mL con 50 mL del medio correspondiente, cubriéndolos con papel Parafilm™ para protección durante 24 h.(Figura 7). Una vez transcurrido dicho tiempo se obtuvo el peso de los geles húmedos para determinar la diferencia gravimétricamente.

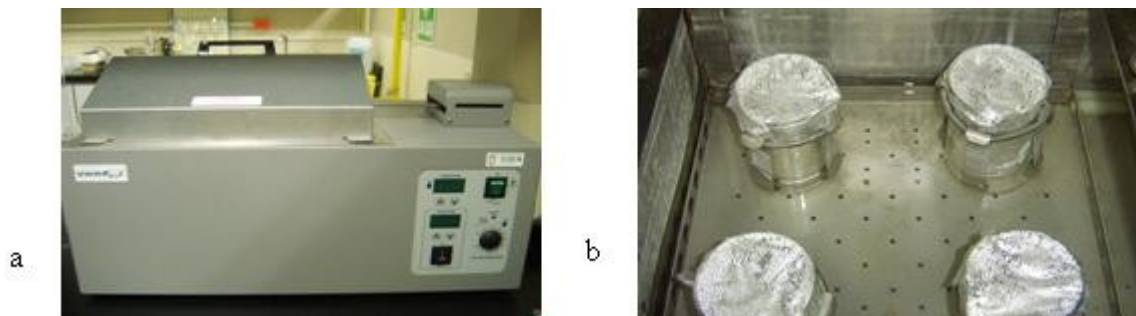


Figura 6. a) Baño con control de temperatura y rpm. b) Vasos con los distintos hidrogeles

Se obtuvo Q con la siguiente fórmula:

$$Q = \frac{(W_{gel\text{humedo}} - W_{gel\text{seco}})}{W_{gel\text{seco}}}$$

siendo: Q = grado de hinchamiento, W = peso

2.4 CARGADO DE LOS GELES

Se preparó una solución de indometacina en etanol con una concentración de 10 mg/mL. Se obtuvo el peso seco de cada hidrogel (P4-05, P4-10, P7-05, P7-10, P10-05 y P10-10) y se colocaron en viales de vidrio; posteriormente se añadieron 10 mL de la solución de indometacina. Se mantuvieron en dicha solución durante 24 h. para después ser extraídos y secados al vacío a 40°C durante 24 h.. Cada disco fue pesado nuevamente, y enseguida se determinó la cantidad de fármaco cargado gravimétricamente (por diferencias de peso).

2.5 LIBERACIÓN CONTROLADA DEL FÁRMACO

La liberación controlada de indometacina se llevó a cabo estudiando el comportamiento de dos hidrogeles: P4-10 y P10-05 bajo dos distintas temperaturas: 25°C y 37°C y pH simulado gástrico (1.2) e intestinal (7.4) sin enzimas, preparados con metodología ya reportada⁸ (1000 ml, sin enzimas). Fue necesario filtrar al vacío con ultrasonido los medios fisiológicos simulados (gástrico e intestinal). El sistema se armó con un recirculador con control de temperatura y dos vasos con chaqueta para recirculación de agua con capacidad de 500 ml y mangueras de látex para flujo de agua. Se vertieron 200 ml del medio correspondiente en cada vaso, ya que las liberaciones fueron realizadas por duplicado. Enseguida se colocó un agitador magnético en cada uno de los vasos. Fue necesario encender el recirculador y el agitador 15 min previos al inicio de la liberación para estabilizar la temperatura. Se colocó el hidrogel previamente cargado con fármaco en los vasos y se dejaron agitando.

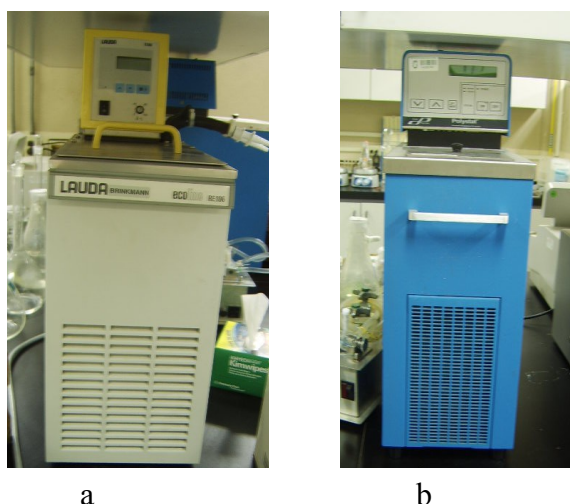


Figura 7. Recirculadores de agua para mantenimiento de temperatura a) LAUDA BRINKMANN[®] y b) COLE PALMER[®]

Las muestras se tomaron cada 15 min durante la primer hora y después con intervalos de 1 h durante 12 h y finalizando con una muestra a las 24 h. Se inició con los geles P10-05 a pH intestinal (7.4) a 25 °C y 37°C, continuando con los geles P4-10 bajo las mismas condiciones. Por último se concluyó realizando liberaciones a pH gástrico (1.2) con los geles P10-05 a 25°C y 37°C. De cada vaso se tomaron alícuotas de 5 ml (con reposición de volumen), se almacenaron a 4°C en tubos de ensayo previamente etiquetados y se leyeron al día siguiente. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 264 nm en un espectrofotómetro UV-VIS utilizando medio gástrico e intestinal como blanco según corresponda. Para el gel C10-05 se realizaron estudios a pH 8.0.

2.6 LIBERACIÓN PULSATIL DE INDOMETACINA

La liberación pulsátil de indometacina fue realizada en tres de los geles preparados previamente (P4-05, P7-05 y P10-05) y con medio intestinal simulado (pH=7.4), el cual fue filtrado al vacío con ultrasonido. Para la liberación del fármaco se

armó el sistema de la misma manera que se hizo anteriormente, solo que por duplicado, es decir utilizando dos recirculadores de agua; el primero de ellos mantuvo la temperatura a 25°C, mientras que el segundo a 45°C. Se vertieron 200 mL del medio intestinal en cada vaso con capacidad de 500 ml. El sistema se encendió aproximadamente 15 minutos antes de iniciar junto con el agitador magnético para estabilizar la temperatura del agua. La liberación pulsátil de indometacina se llevó a cabo durante 6 h, es decir 3 ciclos de 2 h cada uno. El hidrogel en cuestión, cargado y pesado previamente, se colocó primero a 25°C durante 1 h, tomándose muestras volumétricas de 5 ml cada 30 min. Una vez concluido dicho tiempo, el hidrogel fue trasladado con ayuda de una espátula al segundo sistema (45°C), donde de igual manera se mantuvo 1 h, tomando muestras de 5 ml cada 15 min. Las muestras se colocaron en tubos de ensayo con rosca a 4 °C y se leyeron al día siguiente en el espectrofotómetro UV/VIS a 264 nm.

Este procedimiento se llevo a cabo 3 veces, ya que se utilizaron 3 hidrogeles diferentes.



Figura 8. Espectrofotómetro UV/VIS Beckman Coulter®

2.7 LIBERACION ESPECÍFICA DE SITIO CONTROLADA POR EL pH.

Se realizó una liberación de forma controlada y específica, una vez terminados los estudios de liberación pulsátil. Dicha liberación se llevó a cabo con el hidrogel C10-

05 a un pH= 8 durante 12 h continuas a 37°C, tomando muestras cada 15 min la primera hora y prosiguiendo con intervalos de 1 h hasta completar 12 h. Una vez concluido dicho tiempo se obtuvo una muestra a las 24 h. Todas las alícuotas fueron tomadas con pipetas volumétricas de 5 ml y mantenidas a una temperatura de 4°C en tubos de ensayo previamente rotulados. Dichas muestras fueron leídas al día siguiente en el espectrofotómetro UV-VIS a 264 nm.

Por último y para corroborar el comportamiento de los hidrogeles, se realizó una liberación con el hidrogel C04-10 bajo un pH de 1.2 durante 6 h a 37°C, donde las primeras cuatro muestras se tomaron cada 15 min y el resto cada hora durante el tiempo ya mencionado. Al concluir la liberación se obtuvo una muestra final a las 24 h. Las muestras obtenidas fueron almacenadas y leídas de la misma manera que en el resto de las liberaciones

..

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EFECTO DEL pH EN EL HINCHAMIENTO AL EQUILIBRIO

Tal como se observa en la Figura 8, el hidrogel que obtuvo el grado de hinchamiento (Q) mas elevado fue el C04-10 a un pH= 8, mientras que el hidrogel que presentó la Q mas pequeña fue el C10-10. Lo anterior se debe a que a menor pH los grupos carboxílicos se encuentran no ionizados y los metacrilatos de carboxialquilo tienen un carácter hidrofóbico, una vez que el pH aumenta (en promedio a partir de un pH=6), los grupos carboxílicos se ionizan, permitiendo que los metacrilatos de carboxialquilo presenten un comportamiento hidrofílico. En el hidrogel C04-10 la polaridad producida por el grupo carboxilato tiene un mayor “peso” que la hidrofobicidad de la cadena alifática, por lo que a mayor proporción del monómero ácido en el gel mayor hidrofilicidad, lo que se demuestra al tener el mayor Q. También se afecta el pH de transición ya que hay menos interacciones hidrofóbicas facilitando la transición. A medida que se incrementa el fármaco de la cadena, incrementa la hidrofobicidad indicado por un menor Q y un mayor pH de transición.

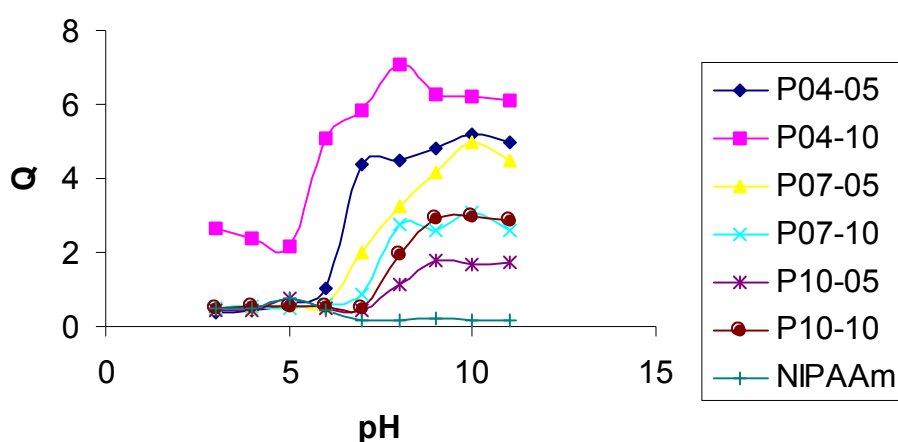


Figura 9. Q con respecto al pH de las diferentes especies de hidrogeles.

3.2 LIBERACIÓN CONTROLADA DEL FÁRMACO

Los hidrogeles utilizados para la liberación controlada de indometacina fueron C4-10 (pH=7.4, T=25°C y 37°C) y C10-05 (pH=1.2 y 7.4, T=25°C y 37°C) obteniéndose la fracción liberada de fármaco ($W_{\text{liberado}}/W_{\text{cargado}}$) durante 12 h (ver Figura 10). Los resultados obtenidos demuestran que la liberación de indometacina fue mayor en el hidrogel C04-10 a un pH intestinal (7.4) y bajo ambas temperaturas, aunque de manera mucho más evidente a 25°C. El hidrogel C10-05 se ubica en el segundo sitio permitiendo la liberación del fármaco mayormente a 25°C. Dichos hidrogeles bajo el mismo pH a 37°C, se colocaron en el tercer y cuarto sitio respectivamente.

Se realizó una liberación demostrativa con el hidrogel C10-05 bajo ambas temperaturas a pH gástrico (1.2) durante 6 h, donde la fracción liberada fue mínima.

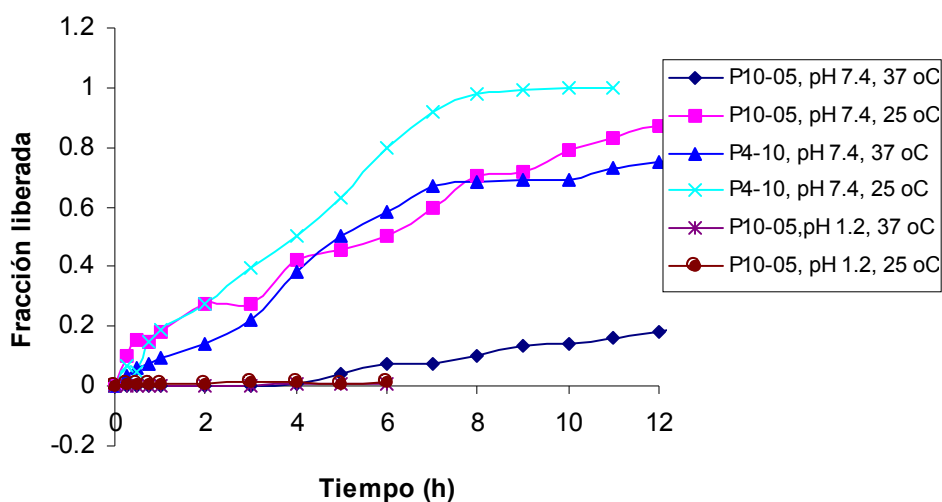


Figura 10. Liberación controlada de indometacina de dos distintas especies de hidrogeles a T= 25°C y 37°C y pH= 1.2 y 7.4.

Los resultados obtenidos demuestran que a mayor pH los hidrogeles presentan un carácter hidrofílico, por lo que la fracción liberada de indometacina aumenta debido a la ionización de los grupos carboxílicos. Lo anterior se hace más evidente a una temperatura de 25 °C ya que el gel a esta temperatura se encuentra hinchado. Una liberación mínima se observa en las condiciones en las que los geles están colapsados.

3.3 LIBERACIÓN PULSATIL DEL FÁRMACO

Como ya se explicó con anterioridad, los hidrogeles utilizados para esta liberación fueron: P4-05, P7-05 y P10-05. De cada uno de los geles se obtuvo el Q con respecto al tiempo, la velocidad de liberación del fármaco y la fracción liberada del mismo.

El Q de cada hidrogel estudiado (Ver figura 11,12 y 13), muestra los pulsos que presentaron durante los cambios de temperatura a lo largo de los 3 ciclos. Las graficas demuestran que el comportamiento general de los 3 hidrogeles fue ir de hinchado a colapsado cuando se mantuvieron a una temperatura de 25°C y 37°C respectivamente.

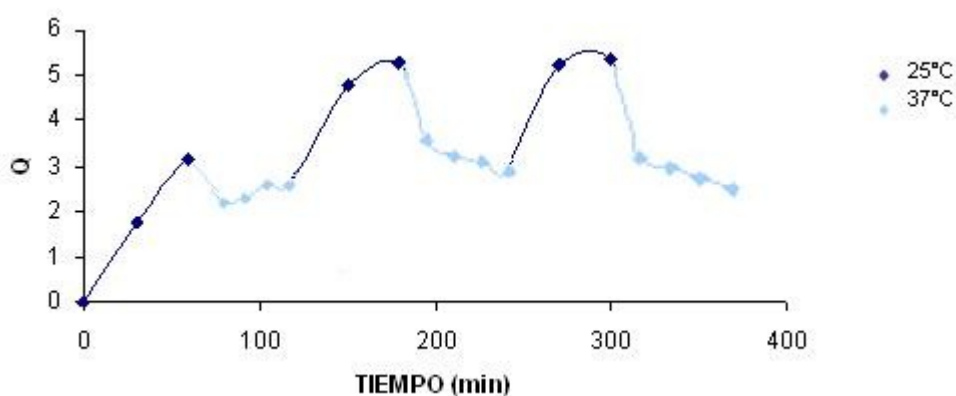


Figura 11. Q del hidrogel P04-10 a 25°C y 37°C durante 3 ciclos.

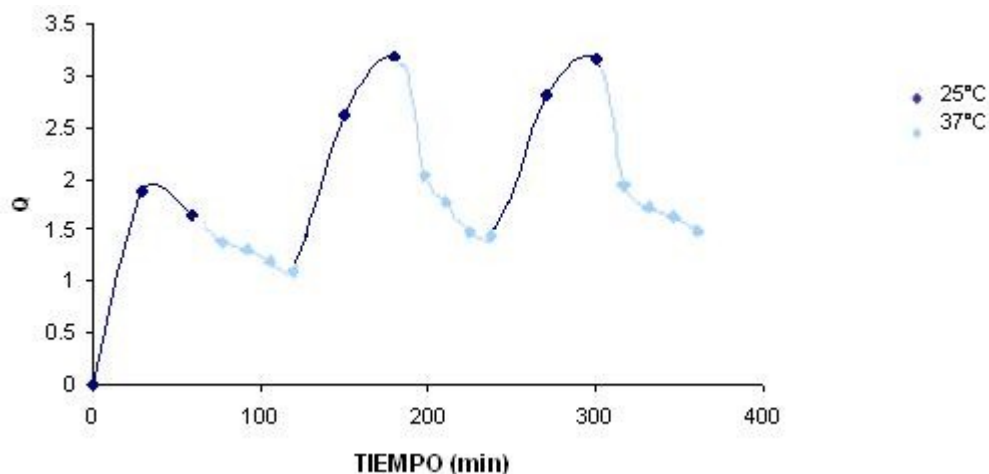


Figura 12. Q del hidrogel P07-05 a 25°C y 37°C durante 3 ciclos

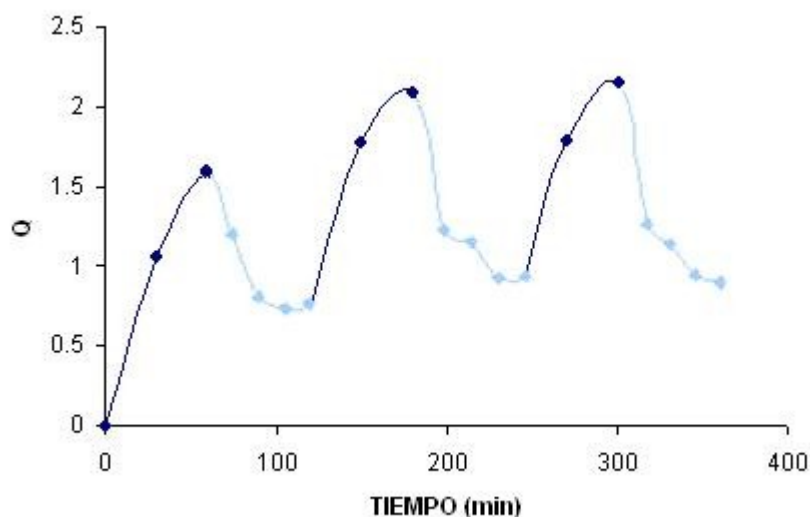


Figura 13. Q del hidrogel P10-05 a 25°C y 37°C durante 3 ciclos

La velocidad de liberación de indometacina presentada por los tres especímenes estudiados (Figuras 13, 14 y 15) fue muy similar, con algunas diferencias derivadas principalmente del tamaño de la cadena del metacrilato de carboxialquilo. Se obtuvieron evidentes liberaciones al disminuir la temperatura a 25°C, lo cual representa un efecto negativo; por otro lado al aumentar la temperatura a 37°C (efecto positivo) las gráficas muestran ciertos pulsos en los que se liberaron pequeñas cantidades de indometacina. El

comportamiento de los tres hidrogeles estudiados fue muy parecido entre si, liberando cantidades proporcionalmente similares durante la primer hora, tal como lo muestran las gráficas.

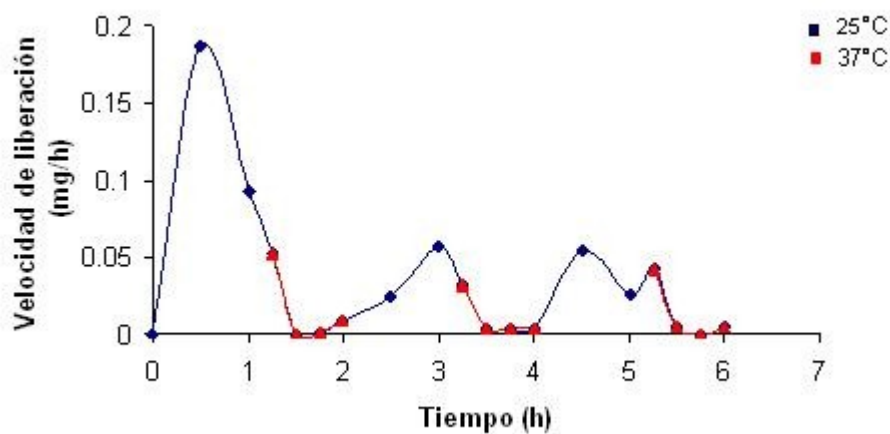


Figura 14. Velocidad de liberación pulsátil del hidrogel P04-10 durante tres ciclos a 25°C y 37°C.

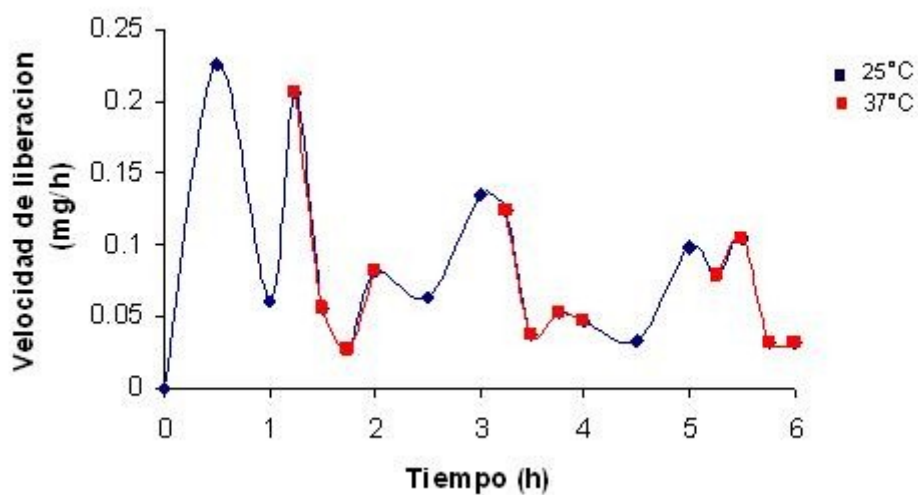


Figura15. Velocidad de liberación pulsátil del hidrogel P07-05 durante tres ciclos a 25°C y 37°C.

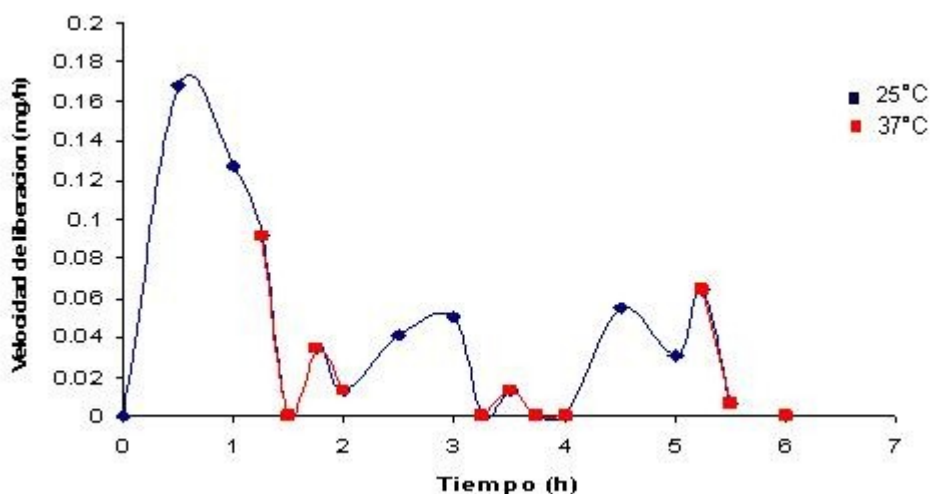


Figura16. Velocidad de liberación pulsátil del hidrogel P10-05 durante tres ciclos a 25°C y 37°C.

El último parámetro analizado fue la fracción liberada de indometacina durante los ciclos realizados. Tal como lo muestran las gráficas (Figura 17,18 y 19) el gel que liberó una cantidad de fármaco mayor durante la primera hora fue el P04-10, seguido del C10-05. En tercer sitio se encuentra el hidrogel P07-05

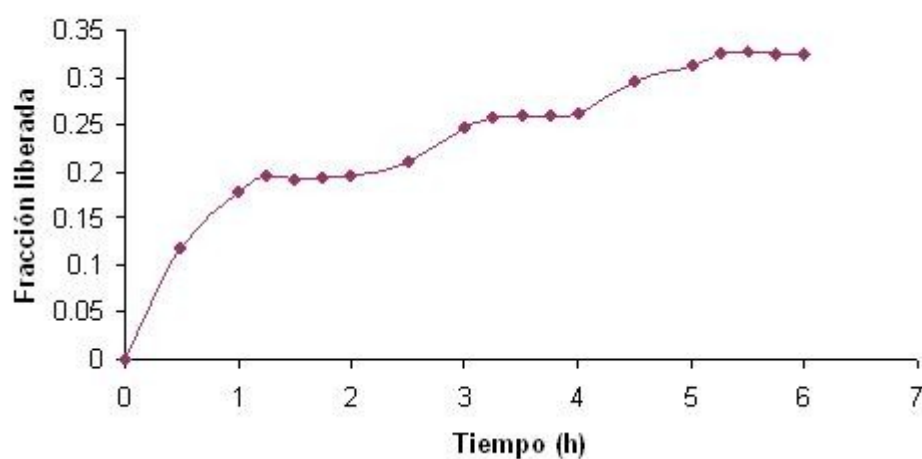


Figura17. Fracción liberada de indometacina del hidrogel P04-10 durante tres ciclos a 25°C y 37°C.

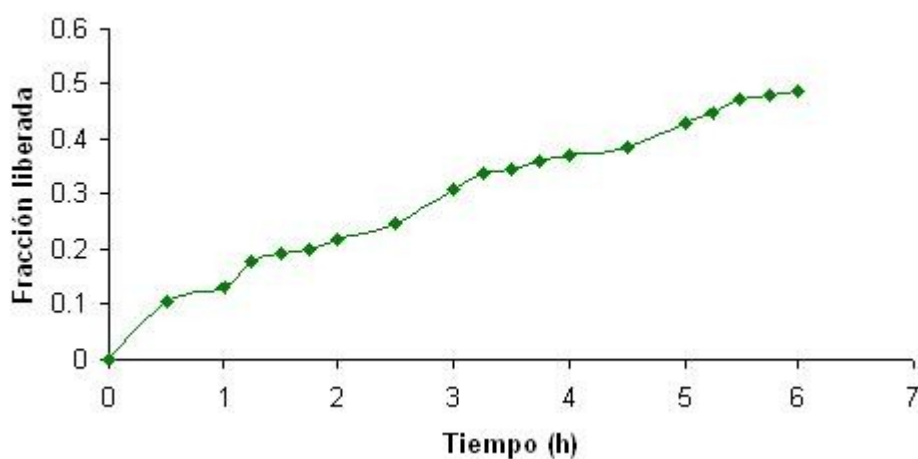


Figura18. Fracción liberada de indometacina del hidrogel P07-05 durante tres ciclos a 25°C y 37°C.

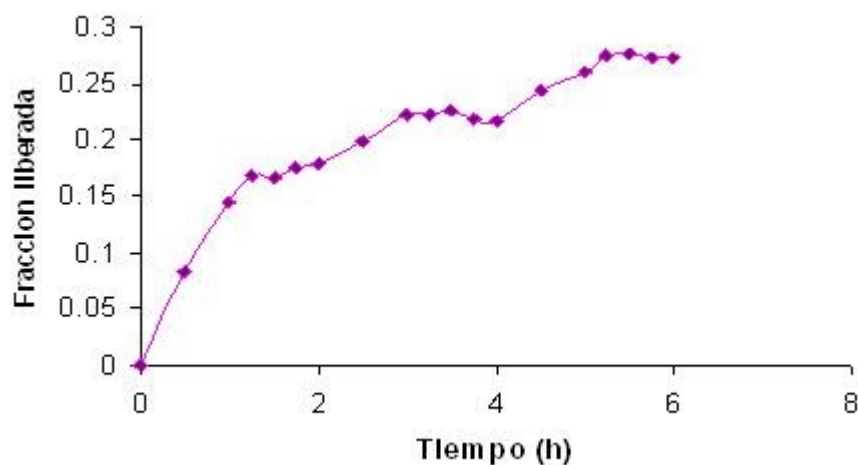


Figura19. Fracción liberada de indometacina del hidrogel P10-05 durante tres ciclos a 25°C y 37°C.

3.4 LIBERACION ESPECÍFICA DE SITIO CONTROLADA POR EL pH

Después de realizar una liberación controlada a pH 8.0, podemos observar en la Figura 20 que el hidrogel P10-05 mostró una marcada hidrofiliicidad y liberó al fármaco de forma gradual y continua durante las 12 horas de dicha liberación. La composición

del hidrogel P10-05 es idónea para la liberación controlada y sostenida de fármacos a un pH alcalino, lo cual se puede aplicar para liberación específica a nivel de colon.

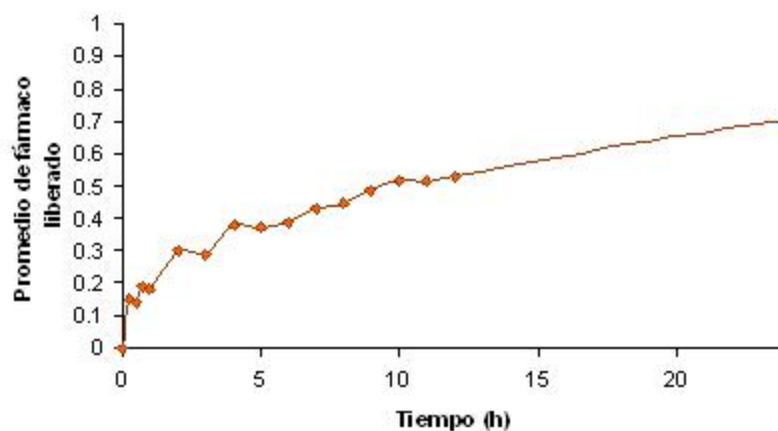


Figura 20. Liberación controlada del hidrogel P10-05 a pH= 8.

Por otro lado se llevó a cabo una liberación de manera similar a la anterior, utilizando el hidrogel P04-10 a pH de 1.2 y 37°C durante 6 h. Se graficó la fracción liberada de indometacina durante dicho tiempo y tal como se observa en la Figura 21, la cantidad liberada fue muy pequeña e inconstante. Esta liberación se realizó de manera demostrativa para corroborar la influencia del pH en el hinchamiento de los hidrogeles.

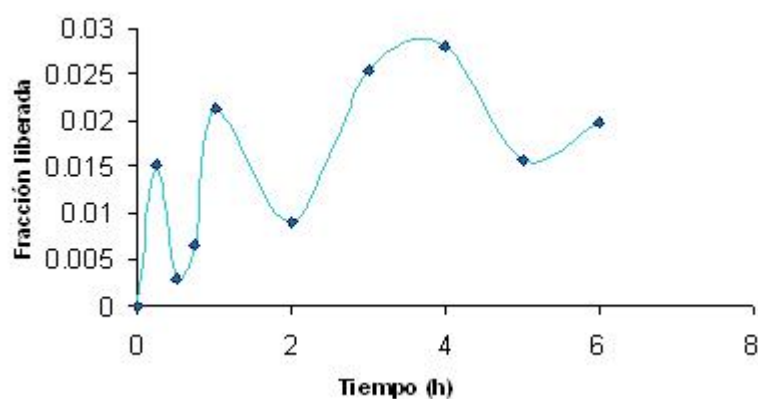


Figura 21. Liberación controlada del hidrogel C4-10 a pH= 1.2.

IV.

CONCLUSIONES

Se prepararon hidrogeles de NIPPAm con metacrilatos de carboxialquilo con cadenas alifáticas de tres longitudes diferentes 4, 7 y 10 carbonos y distintas composiciones molares de los metacrilatos (C4-05, C4-10, C7-05, C7-10, C10-05 y C10-10); con características diferentes como sensibilidad al pH y a la temperatura. Se realizaron pruebas de hinchamiento con respecto al pH para todas las especies de hidrogeles y trabajando con C04-10 y C10-05 para liberación controlada y con C04-05, C7-05 y C10-05 para liberación pulsátil del fármaco modelo.

En base a los resultados sabemos que el hidrogel que obtuvo el Q mas elevado fue el C04-10 a un pH de 8, mientras que el C10-10 que presentó la Q mas pequeña, ya que a mayor pH los grupos carboxílicos se encuentran ionizados y los metacrilatos de carboxialquilo tienen un carácter hidrofílico. Por lo tanto, a mayor hidrofobicidad menor Q y mayor temperatura de transición, por lo que se puede ajustar el equilibrio hinchado-colapsado de los hidrogeles al pH y temperatura requerida para liberación sostenida ajustando la composición de los mismos.

Los hidrogeles liberan el fármaco modelo bajo las condiciones en las que se encuentran hinchados, es decir a una temperatura de 37°C y un pH de 7.4, evitándose la liberación a pH de 1.2, por lo que tienen aplicación para liberación específica en el intestino delgado.

En el caso de ser suficientemente hidrofóbica (C10-05) la liberación ocurre a un pH mas alto (8.0) por lo tanto pueden aplicarse para liberación en el colon.

La liberación pulsátil resulto errática. En la mayoría de los casos esta ocurre a 25°C y no a 37°C (control negativo) aunque en algunos casos no se observan pulsos de liberación.

Se recomienda, como trabajo futuro, estudiar la liberación de péptidos y proteínas con esta serie de materiales poliméricos.

REFERENCIAS

1. V. Ranade, M. Hollinger. Drug Delivery Systems. *Editorial CRC Press*, 52,252-278 (1996).
2. A.S. Hoffman. Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 4-19 (2002)
3. C. S. Brazel and N. A. Peppas. Pulsatile local delivery of thrombolytic and antithrombotic agents using poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) hydrogels, *J. Controlled Release*,39, 57-58 (1996)
4. T. Guerrero-Arreola, G. Beltrán-Lara, A. Licea-Claverie, J.M. Cornejo-Bravo. Liberación controlada de fármacos usando geles sensibles a la temperatura y al pH, conteniendo metacrilatos de carboxialquilo. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 140-141 (2005).
5. A. Kikuchi, T. Okano. Pulsatil drug release control using hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 54-55 (2002).
6. M. K. Chourasia, S. K. Jain. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *J Pharm Pharmaceut Sci.*, 41, 33-34 (2003).
7. A. Gennaro, Remington Farmacia. *Editorial Medica Panamericana*, Tomo 2., 1733-1734 (2000).
8. United States Pharmacopoeia Convention inc. The United States Pharmacopoeia, 2728 (2004).
9. A. Licea-Claverie, E. Rogel Hernandez, R. Salgado-Rodriguez, J.A. López-Sánchez, L.A. Castillo, J.M. Cornejo-Bravo, K.F. Arndt. The use of hydrophobic spacers in the development of new temperature-and pH-sensitive polymers. *Macromol. Symp.*, 207, 193-215 (2004).