

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**OPTIMIZACIÓN MEDIANTE MODIFICACIONES
FARMACOTÉCNICAS DE MATRICES POLIMÉRICAS:
DESARROLLO DE FORMULACIONES ALTERNATIVAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Rosa Virto García

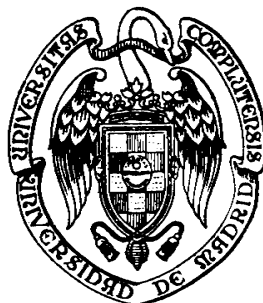
Bajo la dirección de las doctoras

Susana Torrado Durán
Gloria Frutos Cabanillas

Madrid, 2005

ISBN: 84-669-2750-6

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



OPTIMIZACIÓN MEDIANTE MODIFICACIONES
FARMACOTÉCNICAS DE MATRICES POLIMÉRICAS.
DESARROLLO DE FORMULACIONES ALTERNATIVAS

Memoria de Tesis Doctoral
Dña. María Rosa Virto García

Directoras
Dra. Dña. Susana Torrado Durán
Dra. Dña. Gloria Frutos Cabanillas

MADRID, 2005

A través de las siguientes líneas, quiero dejar constancia de mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han prestado su apoyo y colaboración a la hora de realizar este trabajo de investigación.

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento más emotivo a la memoria de la Dra. Dña. Paloma Frutos Cabanillas que nos dejó hace ya dos años. Siguiendo atentamente sus consejos decidí comenzar mi carrera investigadora realizando, bajo su tutela, mi Tesis Doctoral, en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la U.C.M. en el año 1999. Durante los años que tuve la suerte de trabajar con ella aprendí muchas cosas que a lo largo de todo este tiempo me han servido tanto a nivel profesional como personal, siempre serás un referente muy importante en mi vida.

En segundo lugar quiero expresar mi agradecimiento al Dr. D. José Luis Lastrés García, Catedrático del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y a la Dra. Dña. Irene Martín Molina, Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica por haberme permitido realizar mi Tesis Doctoral en este departamento.

De un modo especial, quiero expresar mi agradecimiento a mi directoras de Tesis, Dra. Dña. Susana Torrado Durán y Dra. Dña. Gloria Frutos Cabanillas, por su orientación, ayuda, apoyo y amistad a lo largo de estos años. Ambas, a través de su dedicación han ejercido una influencia determinante en la realización de este trabajo.

A la Dra. Dña. María Paloma Ballesteros Papantonakis, Dr. D. Santiago Torrado Durán, al Dr. D. Juan José Torrado Durán y a todos los profesores del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica por sus consejos y ayuda, y por tantas conversaciones y momentos agradables pasados durante todos estos años.

A la Dra. Dña. María Angeles Elorza Barroeta y Dra. Dña. Begoña Elorza Barroeta, Profesoras del Departamento de Química-Física II, por haberme ayudado en la realización de la última parte de este trabajo de investigación. También al resto de miembros de este Departamento por la cantidad de horas compartidas con ellos mientras trabajaba en el Calorímetro.

Deseo hacer partícipe de este agradecimiento a las doctorandas Celeste y Miriam del Departamento de Parasitología, por todo lo que me han ayudado en los estudios de toxicidad en líneas celulares.

También deseo expresar un agradecimiento especial al Dr. D. Ruggero Bettini, Profesor del Departamento Farmacéutico, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Parma en Italia por haberme permitido desarrollar parte del trabajo de investigación en su grupo, por su ayuda y valiosos consejos, así como a todas las personas que

integraban el departamento y a todos los buenos amigos que hice allí. Gracias a todos ellos por haberme acogido como en casa durante los cuatro meses de estancia.

También quiero agradecer al Dr. D. José Ignacio Pastor, Profesor titular del Departamento de Ciencia de Materiales de la ETSI de Caminos, Canales y Puertos, UPM, su colaboración y gran ayuda en todos los temas relacionados con las propiedades mecánicas de los materiales estudiados, he aprendido mucho en esta materia gracias a todo su conocimiento.

A mis compañeros del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, tanto a los que se fueron como a los que continúan trabajando, por todos los buenos momentos compartidos durante todos estos años.

A mi jefa la Dra. Dña. Pilar Calvo Salve y a mis compañeros de PharmaMar, por toda la ayuda y el apoyo prestado en estos momentos de tanto nerviosismo por el final de la Tesis.

A mis padres, a Juanjo, al resto de mi familia, a mis amigos, por su paciencia, apoyo incondicional, comprensión y buenos consejos durante estos años y por tanto haber hecho posible que haya cumplido mi deseo de realizar la Tesis Doctoral.

Por último deseo expresar mi agradecimiento a la Universidad Complutense de Madrid por haberme concedido la Beca de Formación de Personal Investigador y haberme permitido desplazarme al extranjero para completar así mi formación investigadora.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCION	1
	1.1. OBJETIVO	2
	1.2. PLANTEAMIENTO	2
2.	MODIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS	3
	2.1. INTRODUCCIÓN	3
	2.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	4
	2.2.1. MATERIALES	4
	2.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CEMENTO	6
	2.2.3. DISEÑO DE EXPERIENCIAS	8
	2.2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	9
	2.2.5. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL SULFATO DE GENTAMICINA	9
	2.2.6. ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN	10
	2.2.7. POROSIDAD	11
	2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
	2.3.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	11
	2.3.2. ENSAYO DE CESIÓN DEL FÁRMACO “ <i>IN VITRO</i> ”	24
	2.3.3. POROSIDAD	30
	2.4. BIBLIOGRAFÍA	34
3.	INFLUENCIA DE MODULADORES DE CESIÓN EN LAS PROPIEDADES TÉRMICAS Y CRISTALINIDAD DE CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS	37
	3.1. INTRODUCCIÓN	37
	3.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	43
	3.2.1. MATERIALES	43
	3.2.2. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	43

3.2.3. DIFRACCIÓN DE RAYOS X	44
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
3.3.1. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	44
3.3.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X	58
3.4. BIBLIOGRAFÍA	68
4. INFLUENCIA DE MODULADORES DE CESIÓN EN LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS	71
4.1. INTRODUCCIÓN	71
4.1.1. PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS MATERIALES	71
4.1.2. COMPORTAMIENTO TENSIÓN-DEFORMACIÓN EN POLÍMEROS	78
4.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	80
4.2.1. MATERIALES	80
4.2.2. MEDIDAS DE LA DENSIDAD	81
4.2.3. MEDIDAS DE DUREZA	81
4.2.4. MEDIDAS DE POROSIDAD	82
4.2.5. ENSAYOS DE TRACCIÓN	83
4.2.6. ENSAYOS DE FLEXIÓN EN TRES PUNTOS	84
4.2.7. ENSAYOS DE FRACTURA	85
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
4.3.1. MEDIDAS DE LA DENSIDAD	86
4.3.2. MEDIDAS DE DUREZA	87
4.3.3. MEDIDAS DE POROSIDAD	89
4.3.4. RESISTENCIA A TRACCIÓN	91
4.3.5. MODULO DE ELASTICIDAD	94
4.3.6. RESISTENCIA A FLEXIÓN	95
4.3.7. TENACIDAD DE FRACTURA (K_{IC})	96
4.3.8. ENERGÍA DE FRACTURA (G_F)	98
4.3.9. DISCUSIÓN	99

4.4.	BIBLIOGRAFÍA	101
5.	CITOTOXICIDAD DEL MONÓMERO RESIDUAL EN LA POLIMERIZACIÓN DE CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS	103
5.1.	INTRODUCCIÓN	103
5.1.1.	SENSIBILIZACIÓN E IRRITACIÓN	103
5.1.2.	CITOTOXICIDAD	105
5.1.3.	TERATOGENICIDAD Y TOXICIDAD FETAL	106
5.1.4.	HEMOCOMPATIBILIDAD	106
5.1.5.	GENOTOXICIDAD	107
5.1.6.	CARCINOGENICIDAD	108
5.1.7.	TOXICIDAD SISTÉMICA AGUDA	108
5.1.8.	ESTUDIOS DE IMPLANTACIÓN	109
5.1.9.	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN (RMN- ¹ H)	111
5.2.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	113
5.2.1.	MATERIALES	113
5.2.2.	DETERMINACIÓN DEL MONÓMERO RESIDUAL	113
5.2.3.	ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD	114
5.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	115
5.3.1.	DETERMINACIÓN DEL MONÓMERO RESIDUAL	115
5.3.2.	ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD	119
5.4.	BIBLIOGRAFÍA	121
6.	ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS AL EMPLEO DE CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	125
6a.	ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS BASADAS EN EL EMPLEO DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES	126
6a.1.	INTRODUCCIÓN	126
6a.2.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	128

6a.2.1. MATERIALES	128
6a.2.2. ESTUDIO DE INTERFERENCIA ANALÍTICA	129
6a.2.3. ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD FÁRMACO: EXCIPIENTES	129
6a.2.4. ELABORACIÓN DE COMPRIMIDOS MATRICIALES	129
6a.2.5. RESISTENCIA A LA FRACTURA	130
6a.2.6. ESTUDIOS DE CESIÓN DEL FÁRMACO EN COMPRIMIDOS	130
6a.2.7. ESTUDIO DE TOXICIDAD DEL SULFATO DE GENTAMICINA	131
6a.2.8. ELABORACIÓN DE MICROESFERAS	131
6a.2.9. CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS	132
6a.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	134
6a.3.1. ESTUDIO DE INTERFERENCIA ANALÍTICA	134
6a.3.2. ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD FÁRMACO: EXCIPIENTES	135
6a.3.3. RESISTENCIA A LA FRACTURA	137
6a.3.4. ESTUDIOS DE CESIÓN DEL FÁRMACO EN COMPRIMIDOS	138
6a.3.5. ESTUDIO DE TOXICIDAD DEL SULFATO DE GENTAMICINA	139
6a.3.6. CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS	140
6a.4. BIBLIOGRAFÍA	146
6b. PASTAS DE HIDROXIAPATITA PARA CESIÓN LOCAL DE FCOS	151
6b.1.INTRODUCCIÓN	151
6b.2.METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	154
6b.2.1. MATERIALES	154
6b.2.2. PREPARACIÓN DE PASTAS DE HIDROXIAPATITA	155
6b.2.3. ESTUDIOS DISOLUCIÓN, CESIÓN FÁRMACO, HINCHAMIENTO	156
6b.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	157
6b.3.1. ESTUDIOS DISOLUCIÓN <i>IN VITRO</i>	157
6b.3.2. COMPORTAMIENTO DE HINCHAMIENTO	159
6b.3.3. CESIÓN DE FÁRMACO	160
6b.4.BIBLIOGRAFÍA	162

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de matrices poliméricas como nuevos sistemas de cesión controlada de fármacos para su aplicación en tratamientos óseos ha sido desde hace ya varios años uno de los temas de estudio del equipo de investigación en el que me integré tras finalizar mis estudios de licenciatura. La experiencia de este equipo de investigación en esta línea se encontraba ya avalada por distintos proyectos de investigación de financiación pública, que conjuntamente con la beca de investigación predoctoral Complutense que he disfrutado en los últimos años han permitido el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

Inicialmente esta línea de investigación centró su interés en el estudio de los cementos óseos acrílicos más frecuentemente utilizados en cirugía ortopédica. Pero debido a que las compañías comerciales proveedoras de estos cementos óseos acrílicos no proporcionaban ningún tipo de información acerca de sus características farmacotécnicas y biomecánicas y puesto que esta información era necesaria para su posterior optimización se comenzó realizando un completo estudio de estas características que dio como resultado la publicación y defensa de mi Memoria de Licenciatura.

Una vez realizada una completa caracterización farmacotécnica y biomecánica de los cementos óseos acrílicos, se procedió al desarrollo de diferentes formulaciones modificadas de cementos de polimetilmetacrilato (PMMA). Esta modificación se basó en la inclusión de excipientes hidrosolubles favorecedores de la formación de poros y canales para así mejorar la liberación de los principios activos incluidos en dichos cementos. El principio activo más ampliamente utilizado para la prevención y el tratamiento de infecciones óseas tras las intervenciones quirúrgicas ortopédicas en este tipo de formulaciones es el antibiótico sulfato de gentamicina. El análisis cuantitativo espectrofotométrico de este antibiótico requiere el empleo de una técnica de derivatización complicada (con tiempos de reacción de 30 minutos) anterior a la lectura espectrofotométrica ya que dicho compuesto no tiene absorbancia ni en la región ultravioleta, ni en la visible. Con la ayuda de esta técnica se realizaron los correspondientes estudios de cesión previos a la caracterización farmacotécnica, mecánica y toxicológica de estos cementos modificados.

El hecho de que varias de las propiedades que presentaron estas formulaciones no fuesen óptimas, entre las que cabe destacar la no biodegradabilidad de estos materiales, encaminó a este grupo de investigación hacia la búsqueda de otras posibles alternativas que permitiesen el empleo de polímeros biodegradables y biomateriales osteointegrables. Con este objetivo se desarrollaron y caracterizaron comprimidos de implantación, microsferas y pastas hidrofílicas de hidroxiapatitas.

1.1. OBJETIVO

El objetivo de la presente Tesis es la optimización de cementos óseos mediante la modificación de sus características farmacotécnicas y la búsqueda de otras posibles alternativas que permitan el empleo de polímeros biodegradables y biomateriales osteointegrables, tales como comprimidos de implantación, microesferas y pastas hidrofílicas de hidroxiapatitas.

1.2. PLANTEAMIENTO

1. Formulación mediante un diseño de experiencias de cementos óseos modificados incluyendo distintas proporciones de moduladores de cesión (lactosa e hidroxipropilmetilcelulosa) así como diferentes proporciones de sulfato de gentamicina.
2. Caracterización farmacotécnica de cementos óseos acrílicos modificados mediante el empleo de las técnicas de :
 - Microscopía electrónica de barrido (SEM)
 - Estudios de cesión *in vitro* del sulfato de gentamicina
 - Porosidad (Porosímetro de mercurio)
 - Calorimetría diferencial de barrido (DSC)
 - Difracción de rayos X (PXRD)
3. Caracterización mecánica de estos cementos óseos acrílicos
4. Citotoxicidad del monómero residual en los cementos modificados
 - Determinación del monómero residual mediante la técnica de Resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H)
 - Estudios de citotoxicidad en líneas celulares de macrófagos J774
5. Formulación y caracterización de otras alternativas para tratamientos óseos y odontológicos
 - Comprimidos de implantación de PLGA
 - Microesferas de PLGA y PLA
 - Pastas hidrofílicas de hidroxiapatitas

2. MODIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS

2.1. INTRODUCCIÓN

La osteomielitis crónica en adultos es una infección difícil de tratar y erradicar. Estudios previos han demostrado que la administración sistémica de antibióticos de amplio espectro es insuficiente para disminuir la infección y que se necesitan altas concentraciones del antibacteriano en la zona de infección para minimizar e incluso curar la osteomielitis. Un método muy conocido de liberación local de antibiótico utiliza la implantación quirúrgica de cementos óseos de polimetilmetacrilato (PMMA) que contienen antibiótico (Adams y col., 1992), (Gerhart y col., 1993).

El sulfato de gentamicina (G) es uno de los antibióticos aminoglucósidos más usados para incorporarlo en los cementos óseos acrílicos debido a su amplio espectro antibacteriano y porque a diferencia de muchos otros antibióticos, es estable a las altas temperaturas alcanzadas durante el fraguado del PMMA (Hill y col., 1977). Con este tipo de implantes se evita la aparición de efectos secundarios propios de la administración sistémica del sulfato de gentamicina en el tratamiento de osteomielitis como son nefrotoxicidades, ototoxicidades y complicaciones alérgicas.

Los cementos óseos acrílicos ocupan un lugar destacado dentro de los biomateriales sintéticos. Los cementos acrílicos auto-polimerizables se han usado ampliamente en odontología y cirugía ortopédica como fijadores de prótesis, agentes de relleno de cavidades óseas, separadores en cirugía de reemplazo e incluso se han propuesto para otros usos como dispositivos médicos en el tracto urinario (Tunney y col., 1997). Hay varias desventajas asociadas a los cementos acrílicos comerciales (Lewis, 1997), (Virto y col., 2003). Algunas de ellas son necrosis térmica del hueso, necrosis química debido al monómero liberado que no ha reaccionado en la polimerización, contracción del cemento durante la polimerización, mala distribución del cemento alrededor del implante y escasa adhesión en las interfases porque el cemento es más débil que el hueso o el implante.

Nuestro grupo de investigación centró su atención en la cesión del antibiótico desde estos cementos de PMMA debido a la publicación de algunos datos contradictorios realizados en estudios “*in vitro*” e “*in vivo*”. Por ejemplo se han encontrado datos tanto de una buena liberación del sulfato de gentamicina (Holm y Vejlsgaard, 1976), (Welch, 1978), como de una liberación deficiente de la misma (Elson y col., 1977), (Wahling y Dingeldein, 1980) a partir de un mismo cemento comercial. Tales discrepancias se han atribuido a diferencias en las condiciones experimentales de ensayo (Trippel, 1986) o al uso de técnicas de análisis de baja sensibilidad

(Penner y col., 1999). Por lo tanto, el primer paso de este trabajo fue diseñar un estudio de cesión “*in vitro*”. El cemento óseo estudiado fue el CMW1[®] Radiopaco porque es uno de los más utilizados y su variedad con sulfato de gentamicina (CMW1[®] Gentamicina). Diferentes métodos de análisis del sulfato de gentamicina de distinta sensibilidad se han empleado tales como inmunoanálisis de fluorescencia polarizada (TDx), HPLC y espectrofotometría-UV (Frutos y col., 2000,a), (Sampath y Robinson, 1990), (Zhang y col., 1994), (Frutos y col., 2000,b). El estudio de cesión “*in vitro*” del cemento comercial presentó una cesión baja y errática del sulfato de gentamicina (Torrado y col., 2001).

Según la mayoría de los autores la cesión del fármaco desde esta clase de cementos es esencialmente un fenómeno de superficie (Torrado y col., 2001), (Masri y col., 1995), (Van de Belt y col., 2000). Por otra parte, Van de Belt ha indicado que tanto la rugosidad de la superficie como la porosidad influyen en la cesión del sulfato de gentamicina (Van de Belt y col., 2000).

El objetivo de este trabajo es desarrollar nuevas formulaciones de cementos óseos (cementos modificados) con alta porosidad, que permitan una mejor cesión del antibiótico. Por lo tanto se añadieron moduladores de la cesión tales como lactosa e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). La lactosa se empleó como aditivo hidrofílico. Su disolución forma poros y grietas en la matriz que permite la cesión del sulfato de gentamicina. La HPMC es un excipiente farmacéutico frecuentemente usado en cesión sostenida de comprimidos matriciales hidrofílicos.

En este estudio, la morfología superficial, la cesión del sulfato de gentamicina y la porosidad de las formulaciones modificadas con lactosa e HPMC se compararon con las del cemento comercial.

2.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.2.1. MATERIALES

Se emplearon los cementos comerciales CMW1[®] Radiopaco y CMW1[®] Gentamicina. (DePuy International Ltd., Blackpool Lancashire, Reino Unido).

Cada envase contiene dos componentes, uno de ellos líquido presentado en una ampolla esterilizada dentro de un envase blister y el otro en polvo contenido en una bolsa de polietileno esterilizada dentro de un estuche despegable y uno de protección laminado con papel metalizado para ampararle de la luz.

La composición del cemento se detalla a continuación en la Tabla 1. El componente en polvo está constituido por PMMA prepolimerizado, el iniciador, peróxido de benzoilo, que inicia el

proceso de polimerización y un radiopacificante, el sulfato de bario, que actúa como agente de contraste permitiendo la localización del cemento en radiografías. El componente líquido está constituido fundamentalmente por el monómero, metacrilato de metilo (MMA). En pequeñas cantidades también se encuentra un promotor o acelerador, la N,N'- dimetil- *p*- toluidina (DMPT), que rompe el iniciador para dar lugar a los radicales libres que son verdaderos iniciadores de la polimerización, y un estabilizante, la hidroquinona, que evita que se produzca una polimerización prematura en las ampollas que lo contienen, y que puede tener lugar bajo determinadas condiciones de almacenamiento (luz, temperatura elevada, etc.). El monómero líquido humectará la superficie de las partículas poliméricas del componente sólido y las mantendrá unidas después de la polimerización.

Tabla 1. Composición química de los cementos utilizados.

COMPONENTES	CMW1 [®] RADIOPACO	CMW1 [®] GENTAMICINA
<i>Componente líquido</i> (18,37ml)	<i>(%) p/p</i>	<i>(%) p/p</i>
Metacrilato de metilo (monómero)	98,215	98,215
N,N-dimetil- <i>p</i> -toluidina (promotor)	0,816	0,816
Etanol	0,945	0,945
Ácido ascórbico	0,022	0,022
Hidroquinona (estabilizante)	0,002	0,002
<i>Componente en polvo</i> (40g)	<i>(%) p/p</i>	<i>(%) p/p</i>
Sulfato de gentamicina	-	4,22*
Polimetacrilato de metilo	88,85	84,73
Peróxido de benzoilo (iniciador)	2,05	1,95
Sulfato de bario (radiopacificante)	9,10	9,10

* Equivalente a 1g de gentamicina base.

El fármaco sulfato de gentamicina USP empleado fue suministrado gratuitamente por los laboratorios C.E.P.A., S.A. (Madrid, España).

Los moduladores de la cesión empleados fueron lactosa monohidrato, Pharmatose[®] 325M, (laboratorios DMV International Veghel, Holanda) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), Metolose[®] 65 SH 400, suministrada por Isisa (Barcelona, España).

Para la preparación de todos los reactivos se empleó agua purificada MilliQ.

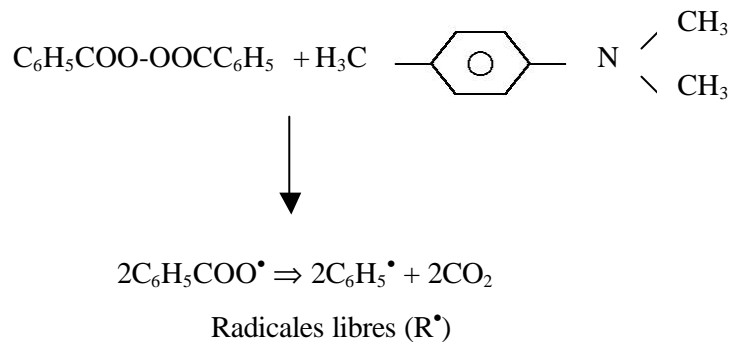
La solución salina tamponada de pH 7,4 empleada en nuestros ensayos se preparó según se detalla en la Farmacopea Americana (USP 26). Todos los productos empleados fueron obtenidos de Panreac Química, S.A. (Barcelona, España).

Para la preparación del reactivo *o*-ftaldialdehído se emplearon *o*-ftaldialdehído y 2-mercaptoetanol obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España), metanol obtenido de Lab-Scan (Dublín, Irlanda) y borato sódico obtenido de Panreac Química, S.A. (Barcelona, España).

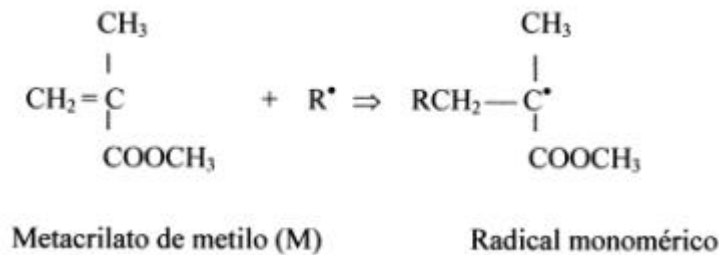
2.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CEMENTO

Los cementos óseos se prepararon usando las condiciones de trabajo más parecidas a las que se utilizan en su administración clínica. Los moduladores de la cesión fueron añadidos al cemento óseo en polvo en las proporciones adecuadas según el diseño de experiencias que se detallará más adelante. En un recipiente adecuado se mezclan durante aproximadamente un minuto cuidadosamente el componente en polvo y el componente líquido hasta formar una masa.

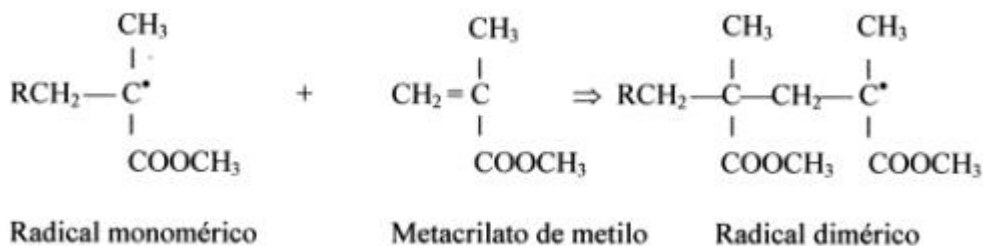
Cuando el líquido se añade al polvo se produce una reacción de polimerización de adición en cadena, siendo las especies reactivas implicadas en el proceso, radicales libres. Cuando entran en contacto el promotor (N,N'- dimetil- *p*- toluidina) y el iniciador (peróxido de benzoilo), se produce la formación de radicales libres por parte del iniciador (Park y Lakes, 1992):



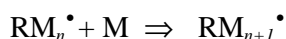
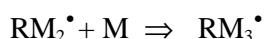
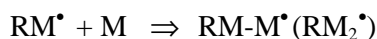
Estos radicales libres reaccionan con el monómero metacrilato de metilo, adicionándose a su doble enlace para dar lugar a un radical monomérico (iniciación) en crecimiento:



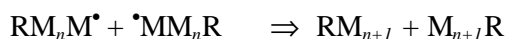
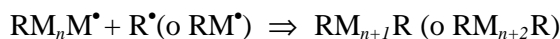
El radical monomérico a su vez reacciona con otro monómero para formar un radical dimérico.



La propagación continuará hasta producir largas cadenas macromoleculares, como queda representado en el siguiente esquema:



El proceso termina mediante la combinación de dos radicales libres mediante procesos de recombinación o desproporción, como se indica en el siguiente esquema:



La duración de cada una de estas fases dependerá del tipo de cemento, de la temperatura, de la humedad y de la manipulación.

Una vez formada la masa con el fin de reducir al mínimo el entrapamiento de aire, y con ello las posibles imperfecciones que pudieran producirse en el cemento, se recoge la masa con la mano y se procede a su amasado durante un minuto. Se prepararon muestras esféricas para los estudios de disolución (peso medio 6g) y muestras cilíndricas (altura = 1,3cm, diámetro = 1cm) para los estudios de porosidad.

Una vez finalizada la producción, el cemento se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 h en una cabina de flujo de aire para asegurar la evaporación del monómero metacrilato de metilo (MMA) que se empleó durante el proceso de producción.

2.2.3. DISEÑO DE EXPERIENCIAS

Para evaluar el efecto de la adición de diferentes proporciones del antibiótico sulfato de gentamicina y del modulador de la cesión (lactosa o HPMC) en la cantidad de sulfato de gentamicina cedida desde los cementos, se utilizó la metodología del Diseño de Experimentos.

Se usaron dos diseños factoriales 2^2 uno de ellos para las formulaciones con lactosa y el otro para los cementos modificados con la HPMC, con dos variables, porcentajes de modulador y sulfato de gentamicina a dos niveles cada uno de ellos (Tablas 2a y 2b). Las experiencias se realizaron en orden aleatorio. Las Tablas 2a y 2b también incluyen cuatro experiencias replicadas en el punto central del diseño, realizadas con objeto de estimar el error experimental. La variable dependiente (Y) corresponde a la cantidad de sulfato de gentamicina liberada. La variable independiente X_1 corresponde al porcentaje de modulador incluido en la formulación (lactosa o HPMC). Los niveles más altos y más bajos (20% y 10% de modulador) se eligieron de acuerdo con la información obtenida en experiencias piloto realizadas previamente. Porcentajes de modulador inferiores al 10% no presentan una diferencia significativa en la cesión del fármaco con respecto al cemento comercial. Porcentajes superiores al 20% de modulador producen una masa plástica difícil de mezclar. La variable independiente X_2 corresponde al porcentaje de sulfato de gentamicina incluido en la formulación. El nivel más bajo de fármaco estudiado (4%), correspondió al porcentaje de sulfato de gentamicina incluido en la formulación comercial (CMW1[®] Gentamicina). El nivel más alto de fármaco estudiado (8%) se seleccionó porque producía un aumento significativo en la cantidad de sulfato de gentamicina cedida (Diez-Peña y col., 2002).

Las diferentes formulaciones se nombraron por medio de un número (orden randomizado correspondiente al diseño de experiencias) y una letra (L para las formulaciones que incluyen lactosa y H para las formulaciones con HPMC).

Tabla 2a. Diseño factorial 2^2 . La variable independiente X_1 corresponde al porcentaje de modulador incluido en la formulación (lactosa). La variable independiente X_2 corresponde al porcentaje de sulfato de gentamicina incluido en la formulación.

VARIABLE X_1 (%) ^a	VARIABLE X_2 (%) ^a	NOMENCLATURA FORMULACIÓN
10	4 ⁽³⁾ b	3L
20	4 ⁽⁷⁾ b	7L
10	8 ⁽⁶⁾ b	6L
20	8 ⁽⁸⁾ b	8L
15	6 ⁽⁴⁾ b	4L
15	6 ⁽⁵⁾ b	5L
15	6 ⁽¹⁾ b	1L
15	6 ⁽²⁾ b	2L

^a Porcentaje referido al componente en polvo del cemento.

^b Orden aleatorio según el cual fueron realizadas las experiencias, y que dio lugar a la nomenclatura de las formulaciones.

Tabla 2b. *Diseño factorial 2². La variable independiente X₁ corresponde al porcentaje de modulador incluido en la formulación (HPMC). La variable independiente X₂ corresponde al porcentaje de sulfato de gentamicina incluido en la formulación.*

VARIABLE X ₁ (%) ^a	VARIABLE X ₂ (%) ^a	NOMENCLATURA FORMULACIÓN
10	4 ⁽¹⁾ b	1H
20	4 ⁽⁷⁾ b	7H
10	8 ⁽⁶⁾ b	6H
20	8 ⁽²⁾ b	2H
15	6 ⁽⁸⁾ b	8H
15	6 ⁽³⁾ b	3H
15	6 ⁽⁴⁾ b	4H
15	6 ⁽⁵⁾ b	5H

^a Porcentaje referido al componente en polvo del cemento.

^b Orden aleatorio según el cual fueron realizadas las experiencias, y que dio lugar a la nomenclatura de las formulaciones.

2.2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La morfología superficial de los cementos óseos modificados antes de haber realizado el ensayo de cesión y después de haberlo realizado se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio Jeol JSM-6400 (Japan Electrón Optics Lab., Tokio 196, Japón) que trabaja a una tensión de aceleración de 20 KV y su resolución máxima es de 35 Å. Todas las fotografías se tomaron a diferentes aumentos para la identificación morfológica de la superficie. Las muestras se recubrieron con una fina lámina de oro para favorecer su conductividad.

2.2.5. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL SULFATO DE GENTAMICINA

El procedimiento propuesto por Sampath para el análisis del sulfato de gentamicina (Sampath y Robinson, 1990), con una pequeña modificación introducida por Zhang (Zhang y col., 1994) se usó en este trabajo para el análisis cuantitativo del sulfato de gentamicina.

Para la obtención del reactivo *o*-ftaldialdehído se adicionaron 2,5 g de *o*-ftaldialdehído, 62,5 ml de metanol y 3 ml de 2-mercaptoetanol a 560 ml de una solución acuosa de borato sódico 0,04 M. El reactivo se guardó en una botella topacio para su protección de la luz solar en la oscuridad al menos durante 24 horas, antes de ser utilizado. Este reactivo puede usarse durante 3 días desde su fabricación.

A la solución problema de sulfato de gentamicina se le adicionó isopropanol (para evitar la precipitación de los productos formados) y el reactivo de *o*-ftaldialdehído en proporción 1:1:1. La mezcla se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. El *o*-ftaldialdehído reaccionó con los grupos amino del sulfato de gentamicina y se obtuvieron productos cromóforos cuyas absorbancias se midieron a 332 nm. Para todas las medidas se usó un espectrofotómetro Beckman DU-7.

2.2.6. ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN

Los estudios de disolución se desarrollaron usando un sistema especialmente diseñado para la cesión de sulfato de gentamicina desde los cementos óseos (Fig.1) (Frutos y col., 2000,b). Este sistema consta de un reactor de vidrio termostatzado herméticamente cerrado para evitar la evaporación del solvente en los largos periodos de tiempo durante los que se lleva a cabo el ensayo (8 semanas). Cada muestra de cemento se introdujo en 150 ml de una solución salina tamponada pH 7,4 sujeta con un cable de acero inoxidable. El ensayo se mantuvo a $37 \pm 0,1$ °C con una agitación constante de 50 rpm. Durante el ensayo de disolución se tomaron 22 alícuotas de 3 ml a intervalos prefijados de tiempo y se filtraron con filtros de membrana de 0,45 μm .

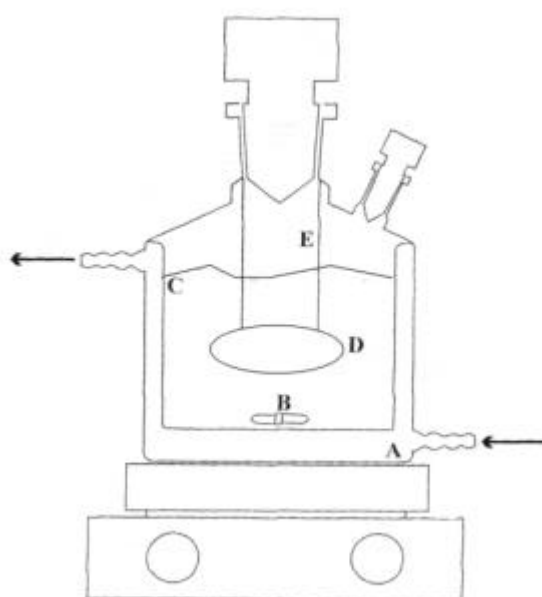


Figura 1. Reactor de vidrio usado para el ensayo de cesión "in vitro". (A) Agua purificada $37 \pm 0,1$ °C, (B) agitador magnético, (C) solución salina tamponada (pH 7,4), (D) muestra de cemento óseo, (E) cable de acero inoxidable.

2.2.7. POROSIDAD

La porosidad de los cementos se determinó por porosimetría de intrusión de mercurio (Micromeritics Pore Sizer 9305, Norcross, GA, USA). Este porosímetro pertenece al Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Santiago de Compostela al cual queremos agradecer que nos permitiese su utilización.

Las muestras se introdujeron completamente secas dentro del porosímetro de baja presión, donde se desgasificaron. El volumen de penetración de mercurio se registró posteriormente mientras la presión de intrusión aumentaba. Las muestras se sacaron de la unidad de baja presión y se introdujeron en el porosímetro de alta presión. El volumen de penetración de mercurio se registró mientras que la presión de intrusión aumentaba a 25.000 psia.

La porosidad total se calculó a partir del volumen de intrusión total mientras que el diámetro de poro se calculó de acuerdo a la ecuación de Washburn (Joschek y col., 2000), (Mehta y col., 2000):

$$D = \frac{-4g \cos \theta}{P}$$

donde D es el diámetro de poro (μm); g la tensión superficial de mercurio (485 dyn cm^{-1}); θ el ángulo de contacto (130°); y P es la presión (psia).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

A continuación se muestran a modo de ejemplo dos microfotografías correspondientes a la superficie de un cemento polimerizado comercial (Fig. 2) y un cemento modificado (Fig. 3) ambas realizadas antes del estudio de cesión.

En la Fig. 2 se observan grandes partículas esféricas de PMMA interconectadas debido al proceso de polimerización. Así mismo, se aprecia la presencia de oquedades debido a la interposición de aire en el proceso de fraguado.

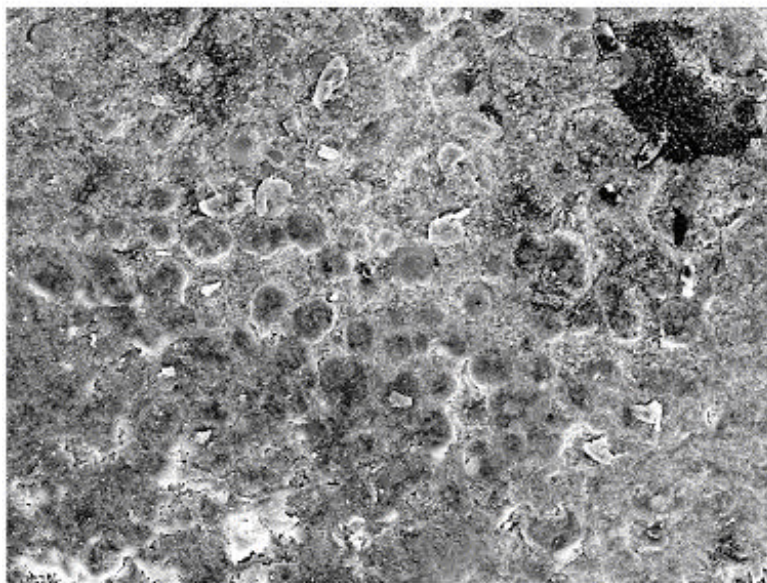


Figura 2. Superficie del cemento CMW1⁰ Radiopaco polimerizado (x200).

Las Figs. 3 y 4 presentan la fotografía de la superficie del cemento modificado (15% L, 6% G), sin ensayar.

En la Fig. 3 se observan unos gránulos esféricos que se corresponden con el PMMA, a los que acompañan formas más o menos poliédricas que se corresponden con los otros constituyentes del cemento (principalmente lactosa). Además se aprecian oquedades irregulares (de 100 a 200 μm) que se han formado por la entrada de aire en la matriz del cemento, cuando han sido elaborados, dando lugar a una interrupción en el proceso de polimerización del PMMA.

En la Fig. 4 en una mayor aproximación a la superficie se observan unos pequeños poros en la superficie del cemento que se agrietan debido a la incidencia del haz de electrones. También se pueden observar pequeñas partículas blanquecinas de forma esférica que se corresponden con el radiopacificante sulfato de bario.

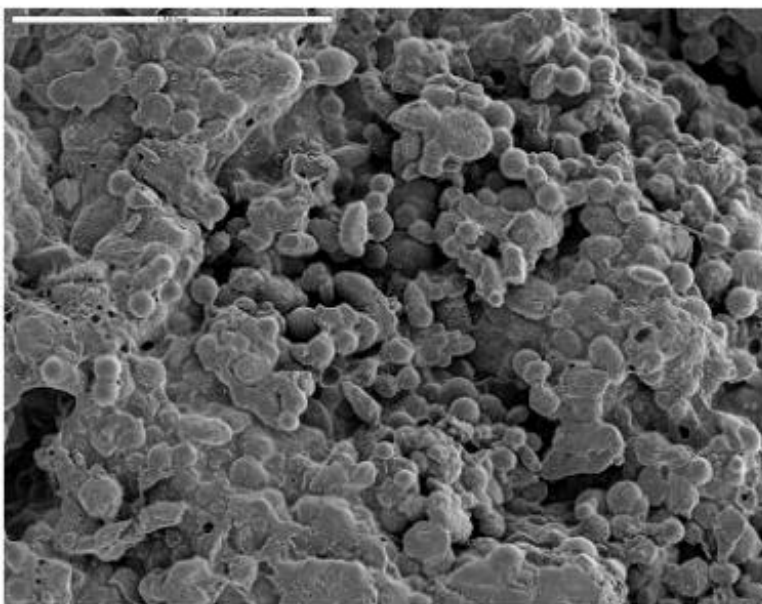


Figura 3. Superficie del cemento modificado 1L (15% L, 6% G), sin ensayar (x100).

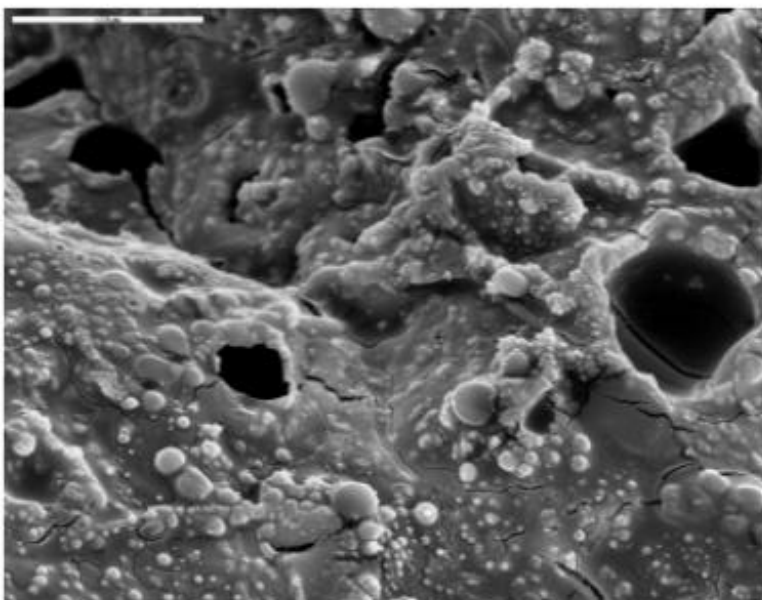


Figura 4. Superficie del cemento modificado 1L (15% L, 6% G), sin ensayar (x1500).

A continuación se muestran varias microfotografías de las muestras de cementos modificados tras haber sido sometidas al ensayo de cesión.

Las Figs. 5 y 6 muestran la superficie del cemento modificado (10% L, 4% G), tras el ensayo de cesión.

En la Fig. 5 ya no se aprecian las partículas poliédricas de lactosa que se observaban en la Fig. 3 de la muestra de un cemento modificado sin ensayar. Así mismo en esta Fig. 5 se aprecian mayores oquedades en la superficie del cemento debido a la disolución de la lactosa en el ensayo

de cesión. También se observan unas partículas blanquecinas muy brillantes, éstas corresponden a partículas de sulfato de bario, que actúan como opacificantes en estos cementos.

En la Fig. 6 en una mayor aproximación del cemento modificado tras el ensayo de cesión se aprecian nuevamente poros similares a los que se apreciaban en la Fig. 4 del cemento antes de ensayar aunque también se aprecian pequeños poros de forma mucho más esférica que se atribuyen a la cesión de las pequeñas y esféricas partículas de gentamicina.

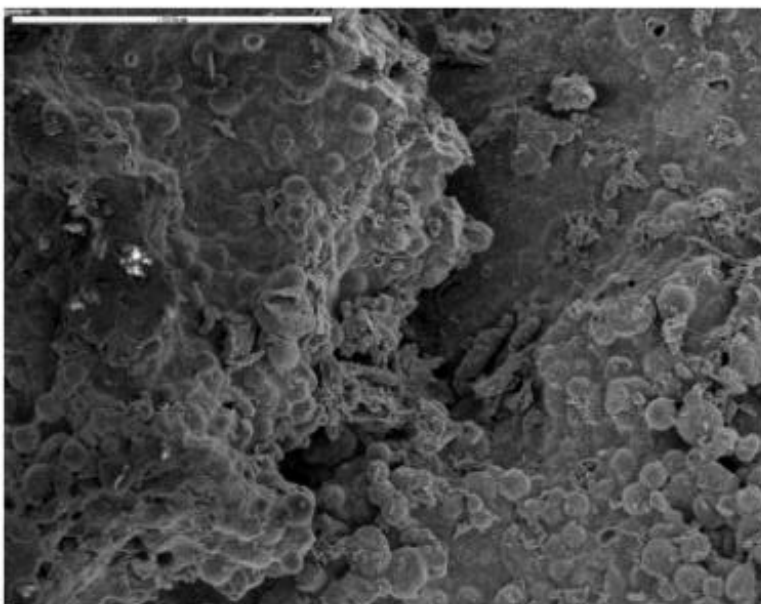


Figura 5. Superficie del cemento modificado 3L (10% L, 4% G), ensayado (x100).

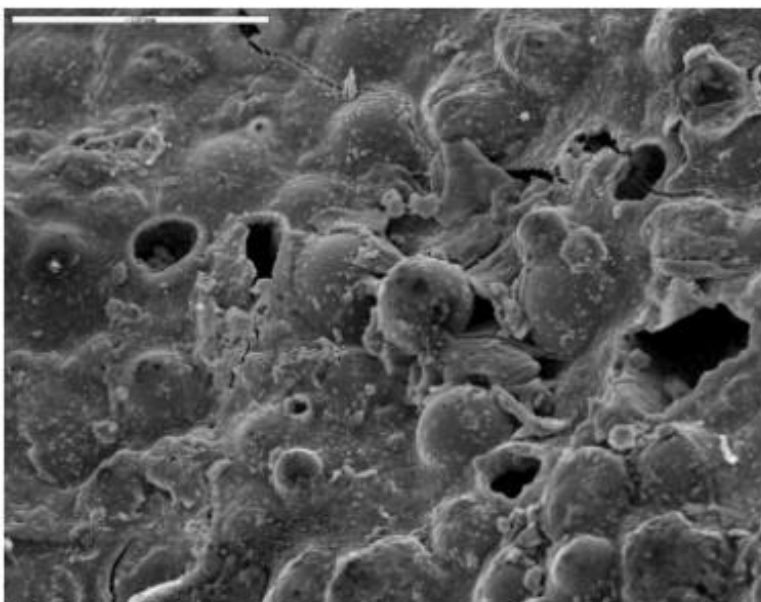


Figura 6. Superficie del cemento modificado 3L (10% L, 4% G), ensayado (x430).

Las Figs. 7, 8, 9 y 10 muestran la superficie del cemento modificado (10% L, 8% G) ensayado en sucesivas ampliaciones.

En la Fig. 7 se puede observar el aspecto general que tiene la superficie de este cemento. Esta superficie presenta mayores oquedades de gran tamaño que la del cemento modificado sin ensayar (ver Fig. 3) debido a la disolución de la lactosa, lo que también da lugar a un menor número de pequeñas irregularidades debidas a la desaparición de las partículas de lactosa. Además, esta superficie presenta un mayor número de pequeños poros que la del cemento modificado sin ensayar.

En la Fig. 8 se aprecian los poros a través de los cuales se ha liberado el sulfato de gentamicina. En las Figs. 9 y 10 se aprecia con detalle el aspecto que tiene uno de estos poros.

Por otra parte, en las Figs. 8, 9 y 10 se observan claramente las pequeñas partículas brillantes correspondientes al sulfato de bario y las grandes partículas esféricas correspondientes al PMMA.

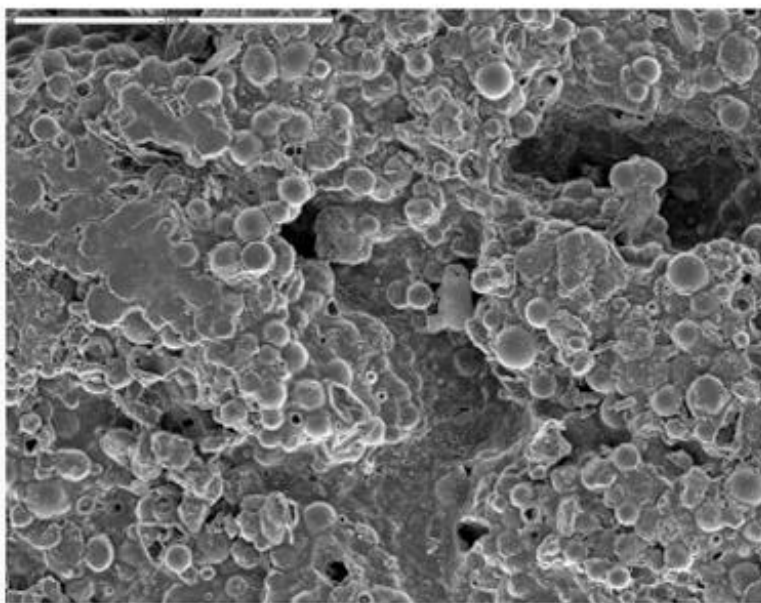


Figura 7. Superficie del cemento modificado 6L (10% L, 8% G), ensayado (x100).

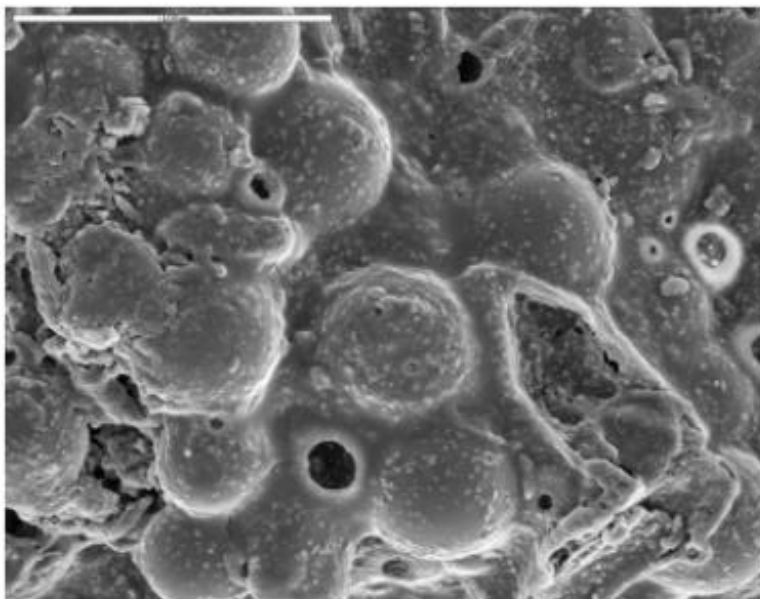


Figura 8. Superficie del cemento modificado 6L (10% L, 8% G), ensayado (x500).

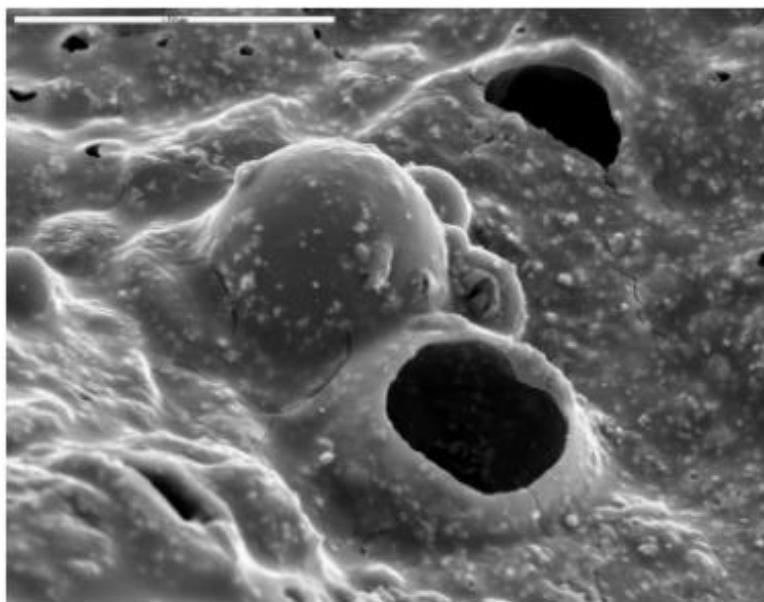


Figura 9. Superficie del cemento modificado 6L (10% L, 8% G), ensayado (x1000).

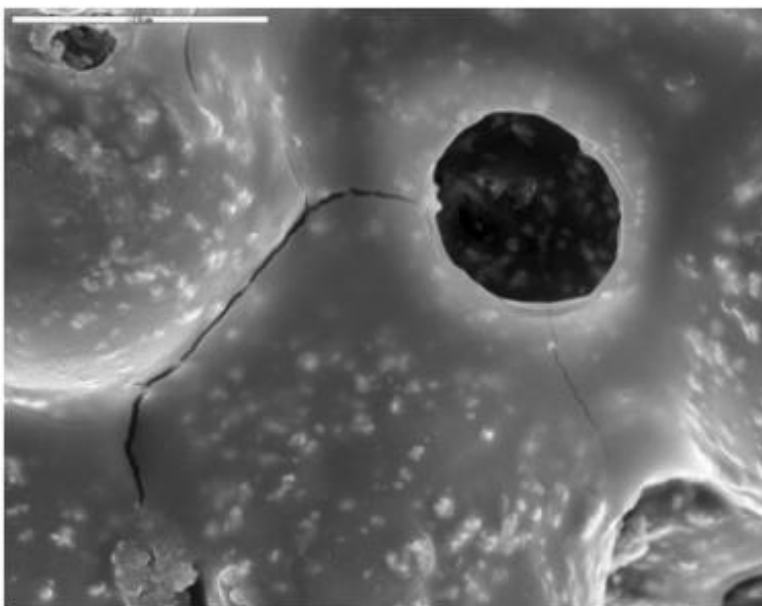


Figura 10. Superficie del cemento modificado 6L (10% L, 8% G), ensayado (x2000).

Las Figs. 11 y 12 muestran la superficie del cemento modificado (15% L, 6% G), ensayado. En las dos primeras microfotografías se puede observar que la lactosa ha entorpecido la polimerización y una vez que este excipiente se libera en el ensayo de disolución, se aprecian los hilos de PMMA que se formaron.

En la Fig. 12 se aprecia claramente una menor interconexión entre las partículas de PMMA que muestran su forma esférica y que en algunas zonas se encuentran unidas fundamentalmente solo por hilos de PMMA.

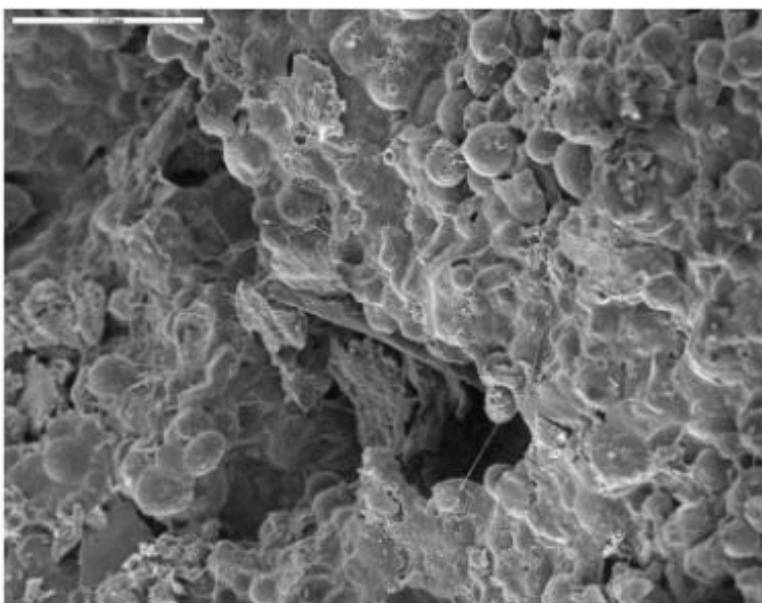


Figura 11. Superficie del cemento modificado 1L (15% L, 6% G), ensayado (x150).

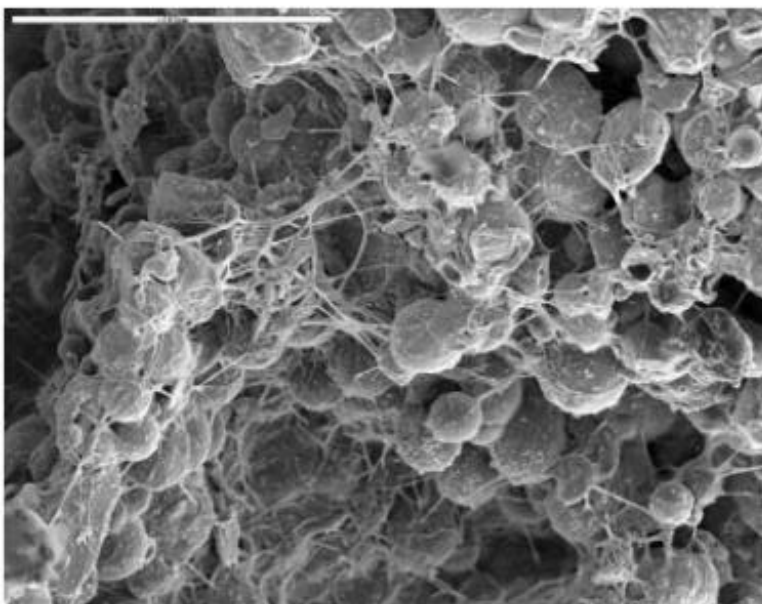


Figura 12. Superficie del cemento modificado 1L (15% L, 6% G), ensayado (x250).

Las Figs. 13 y 14 presentan las microfotografías de la superficie del cemento modificado (20% L, 4% G), ensayado.

En la Fig. 13 se observa una visión general de la superficie de estos cementos, en la que se aprecian las grandes partículas de PMMA de forma esférica y numerosas grandes oquedades de 200 μm a más de 500 μm . También se aprecian nuevamente los hilos de PMMA que se han formado en el proceso de polimerización debido a la interposición de las partículas de lactosa.

En la Fig. 14 se observan los hilos de la polimerización mencionados anteriormente. En esta fotografía vemos como en el interior de una grieta se ven un conjunto de partículas blanquecinas y muy brillantes, esto corresponde al sulfato de bario.

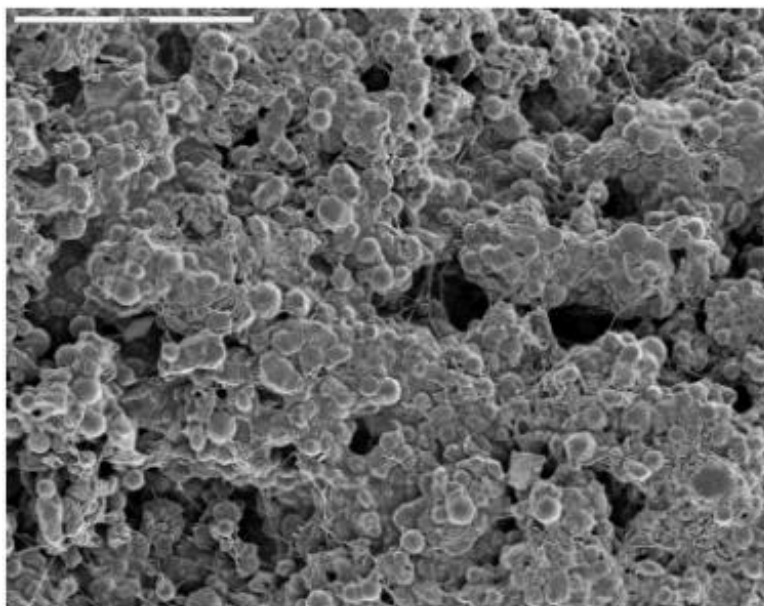


Figura 13. Superficie del cemento modificado 7L (20% L, 4% G), ensayado (x15).

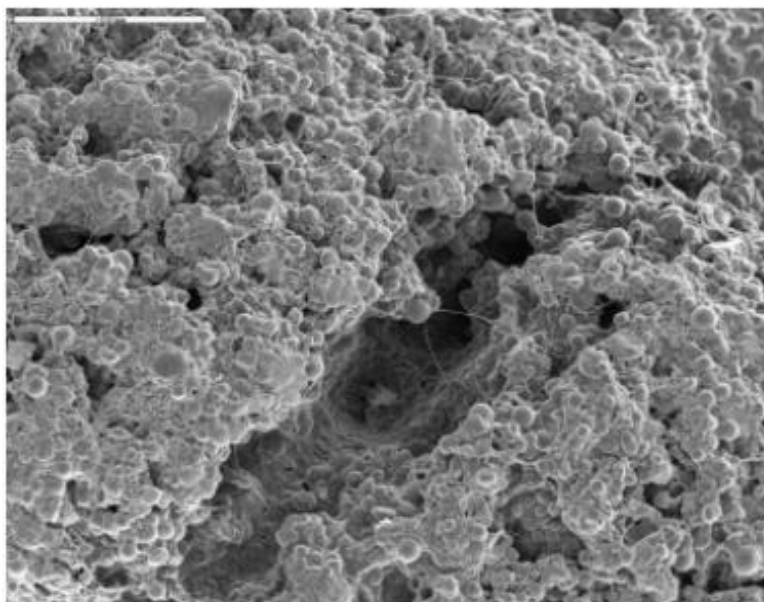


Figura 14. Superficie del cemento modificado 7L (20% L, 4% G), ensayado (x60).

Las Figs. 15 y 16 presentan la fotografía de la superficie del cemento modificado (20% L, 8% G), ensayado. En ellas se observa que en la superficie hay gran cantidad de oquedades, debido a la mayor cantidad de lactosa. Nuevamente se aprecian hilos de PMMA al igual que ocurre con todas las formulaciones que contienen más de un 10% de lactosa.

En la Fig. 16 se muestra la superficie de un cemento modificado que contiene un 20% de lactosa a 430 aumentos, en la que se aprecia un mayor número de oquedades, irregularidades y poros que los que se apreciaban en un cemento modificado con la mitad de lactosa a los mismos aumentos (ver Fig. 6).

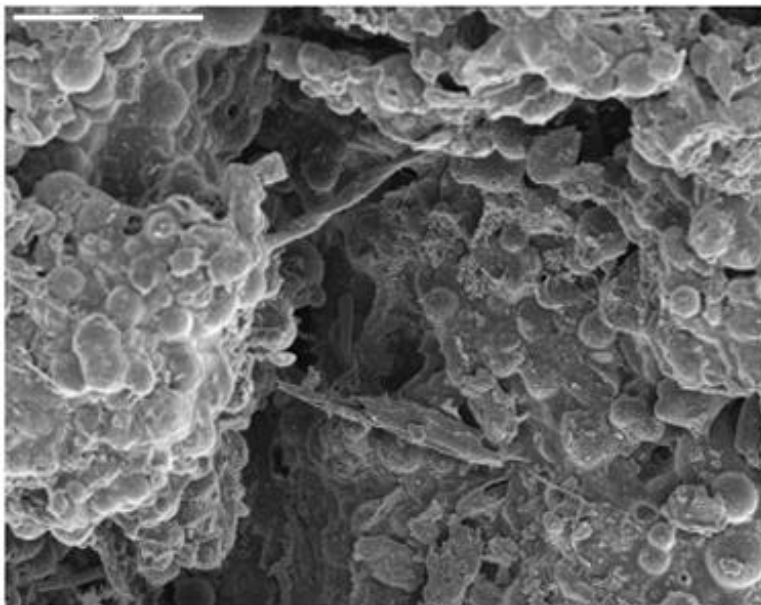


Figura 15. Superficie del cemento modificado 8L (20% L, 8% G), ensayado (x150).

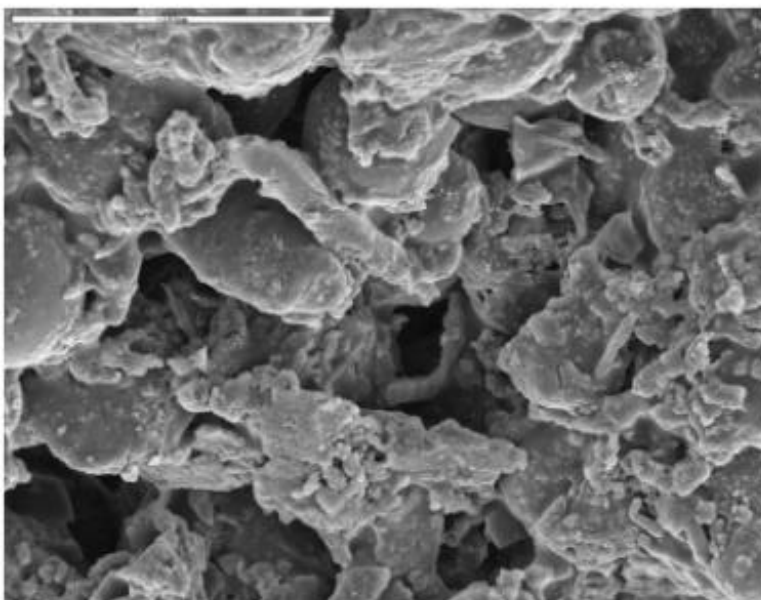


Figura 16. Superficie del cemento modificado 8L (20% L, 8% G), ensayado (x430).

La superficie de los cementos modificados con HPMC fue muy diferente a los que contenían lactosa.

En primer lugar se muestra a modo de ejemplo el aspecto de la superficie de un cemento modificado que contiene una proporción intermedia tanto de HPMC como de gentamicina (15% HPMC, 6% G) antes del ensayo de cesión. En esta imagen se pueden ver además de las grandes estructuras redondeadas de PMMA, las partículas con la apariencia de escamas correspondientes a la HPMC.

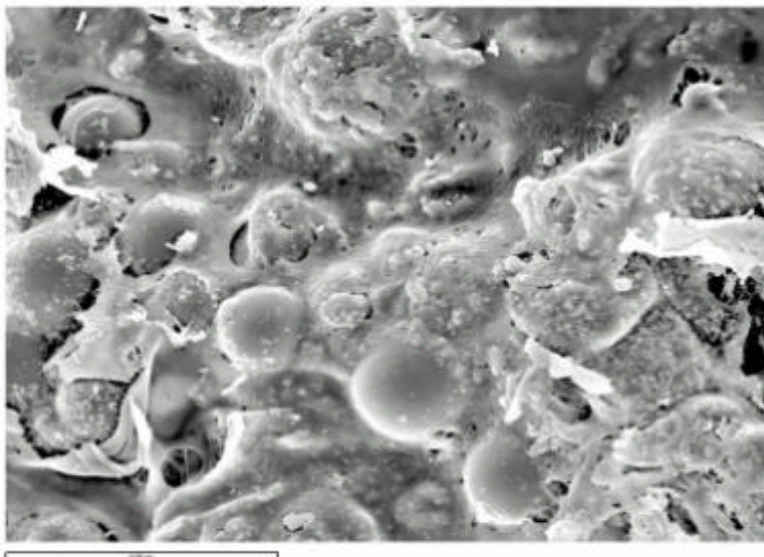


Figura 17. Superficie del cemento modificado 4H (15% HPMC, 6% G), sin ensayar ($\times 430$).

Las Figs. 18-22 muestran las superficies de los cementos modificados con HPMC tras los correspondientes estudios de cesión. En todas estas microfotografías se observa una superficie laminada y escamosa que se atribuye a la solidificación del gel formado por la HPMC en el ensayo de cesión. En estas figuras solo aparecen de forma esporádica las grandes partículas esféricas de PMMA ya que quedan enmascaradas por la presencia de la HPMC tras el ensayo de cesión y que sin embargo si se apreciaban en el cemento modificado antes del ensayo de cesión (ver Fig. 17).

En las Figs. 18 y 20 se aprecian claramente pequeños poros esféricos originados por la disolución de partículas de gentamicina.

En las Figs. 19, 21 y 22 estos pequeños poros no se ven a causa de la superficie laminada y escamosa de la gelificación de la HPMC.

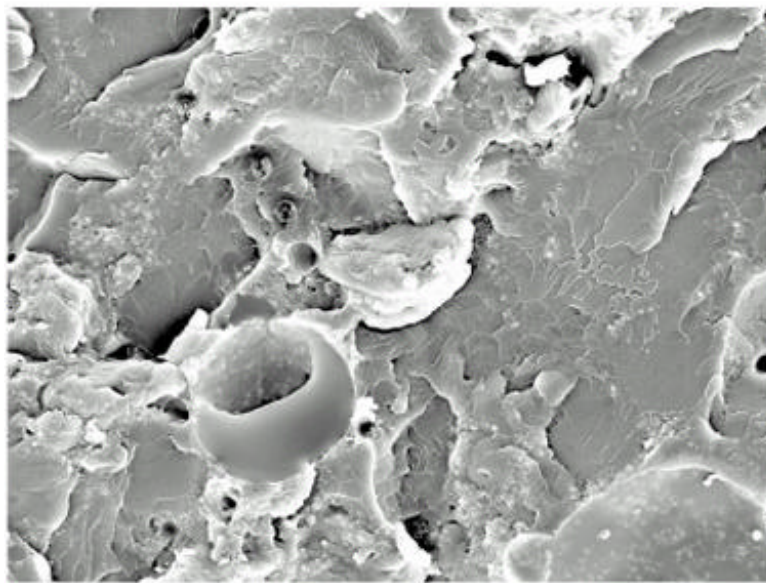


Figura 18. Superficie del cemento modificado 1H (10% HPMC, 4% G), ensayado (x430).

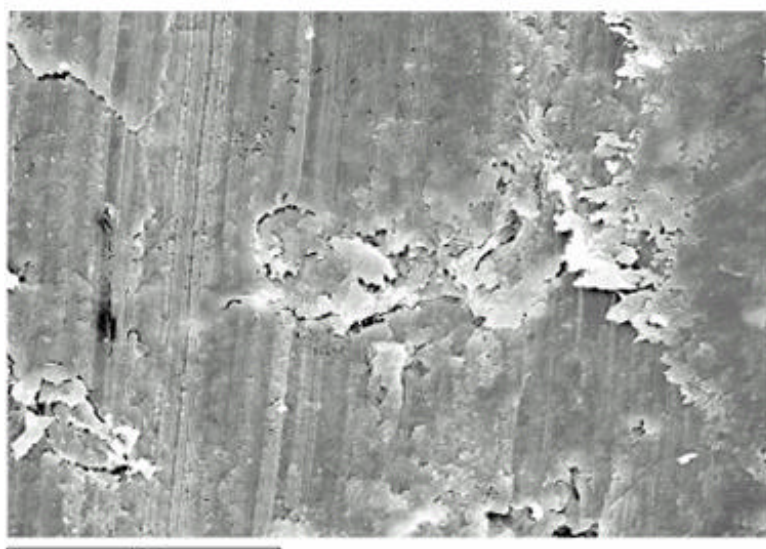


Figura 19. Superficie del cemento modificado 6H (10% HPMC, 8% G), ensayado (x430).

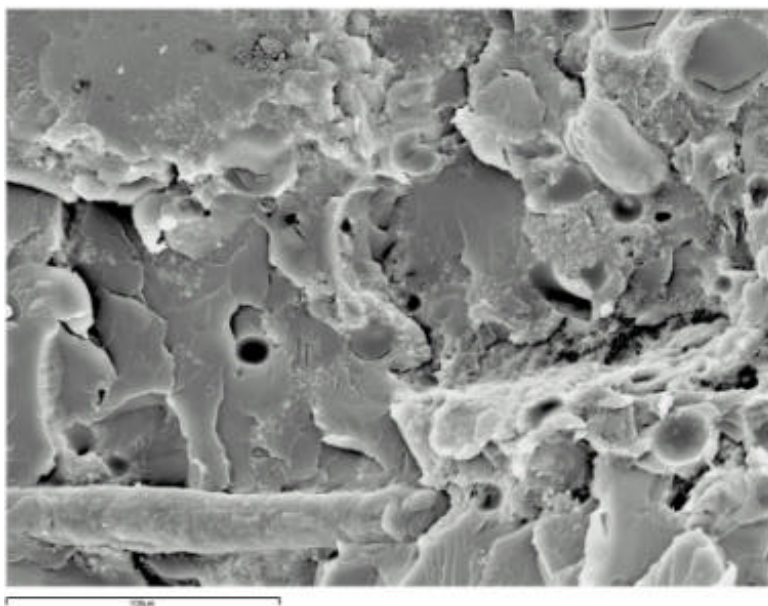


Figura 20. Superficie del cemento modificado 4H (15% HPMC, 6% G), ensayado (430).

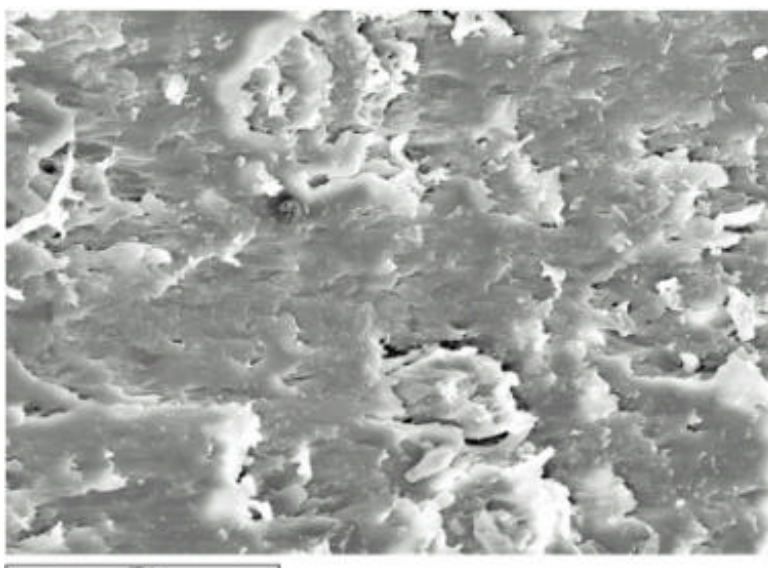


Figura 21. Superficie del cemento modificado 7H (20% HPMC, 4% G), ensayado (430).

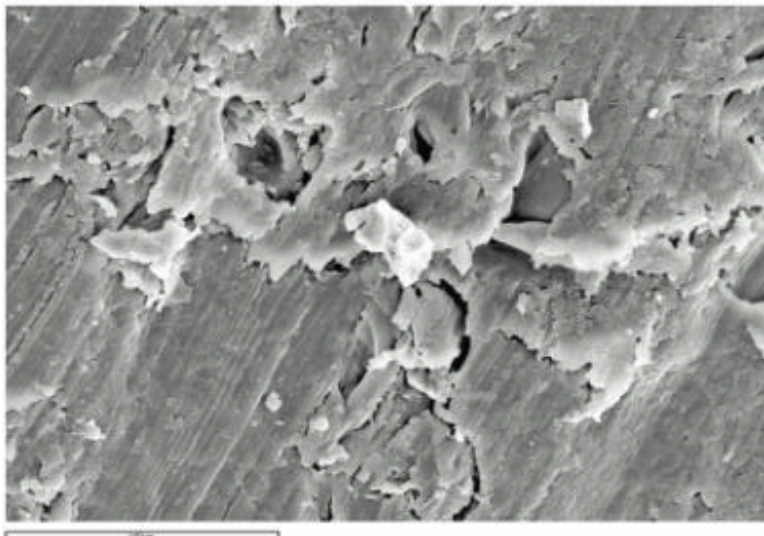


Figura 22. Superficie del cemento modificado 2H (20% HPMC, 8% G), ensayado (~ 430).

2.3.2. ENSAYO DE CESIÓN DEL FÁRMACO “IN VITRO”

La Tabla 3 presenta el porcentaje de sulfato de gentamicina cedido en la primera toma de muestra (a las 3 h) y el porcentaje de cesión total acumulado (a las ocho semanas de iniciado el ensayo). La lenta cesión inicial de la gentamicina en los cementos modificados con HPMC originó que la primera toma de muestra en este tipo de formulaciones se realizará a las 6 horas.

El porcentaje de cesión del sulfato de gentamicina desde las formulaciones con lactosa fue más alto que en las formulaciones con HPMC. El mayor porcentaje cedido de gentamicina fue de un 13,17% de la cantidad total que se corresponden con la formulación 7L que contiene un 20% de lactosa y un 4% de gentamicina. La formulación 1L presentó una mayor cantidad cedida acumulada (9,97%) que las formulaciones 2L, 4L y 5L (7,08%; 7,82% y 7,75%) (todas ellas con un contenido de un 15% de lactosa y un 6% de gentamicina) esta mayor liberación de la formulación 1L se atribuye a alguna irregularidad de la muestra que produjo ya en el primer tiempo del ensayo un mayor cesión de la gentamicina.

El porcentaje de sulfato de gentamicina cedido en la primera toma de muestra osciló entre el 30% y el 60% de la cesión total del sulfato de gentamicina de todo el ensayo. La Tabla 3 también incluye el área bajo la curva (AUC). Se observó una diferencia significativa entre los valores de AUC correspondientes a las formulaciones con lactosa e HPMC. Los valores más altos de AUC corresponden a las formulaciones 7L y 8L (15781,25 y 15719,68 %/h, respectivamente). Estos valores no se encuentran afectados por el porcentaje de sulfato de gentamicina incluido en la formulación (4-8% p/p).

Tabla 3. Efectos del porcentaje de lactosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y sulfato de gentamicina en la cantidad de sulfato de gentamicina cedido desde cementos óseos acrílicos modificados.

MUESTRA	PORCENTAJE LACTOSA (p/p) ^a	PORCENTAJE HPMC (p/p) ^a	PORCENTAJE GENTAMICINA (p/p) ^a	C _i ^b (%)	C _t ^c (%)	AUC (%/h)
1L	15	-	6	6,00	9,97	13496,10
2L	15	-	6	3,40	7,08	8936,57
3L	10	-	4	3,15	6,21	7757,66
4L	15	-	6	3,80	7,82	9807,34
5L	15	-	6	4,55	7,75	10155,60
6L	10	-	8	3,67	6,81	8742,16
7L	20	-	4	5,85	13,17	15781,25
8L	20	-	8	6,04	12,28	15719,68
1H	-	10	4	0,87	3,09	211,22
2H	-	20	8	1,19	3,95	272,71
3H	-	15	6	1,07	2,50	172,17
4H	-	15	6	0,75	1,84	125,36
5H	-	15	6	0,94	2,54	174,37
6H	-	10	8	1,24	3,20	220,35
7H	-	20	4	1,05	3,22	221,82
8H	-	15	6	0,88	2,30	158,50
CMW1 [®] G	-	-	4	1,45	2,91	-

^a Porcentaje referido al componente en polvo del cemento.

^b Porcentaje de sulfato de gentamicina cedido en la primera toma de muestra.

^c Porcentaje de sulfato de gentamicina cedido total acumulado a las 1344 horas.

La Fig. 23a representa la influencia de la cantidad de lactosa y sulfato de gentamicina añadida en la cesión del sulfato de gentamicina. Cuando el porcentaje de lactosa aumentó desde 10-20%, se liberó mayor cantidad de sulfato de gentamicina. Sin embargo, el porcentaje de sulfato de gentamicina incluido en la formulación (4-8% p/p) no produjo un aumento en el porcentaje de sulfato de gentamicina cedido.

La Fig. 23b representa la influencia de la cantidad de HPMC y sulfato de gentamicina añadida en la cesión del sulfato de gentamicina. La HPMC es un excipiente hidrosoluble pero crea un medio muy viscoso que produce una cesión lenta del fármaco. Por lo tanto, la cantidad de sulfato de gentamicina cedido desde estos cementos que contienen HPMC fue prácticamente igual a la del cemento comercial (ver Tabla 3). La cantidad de sulfato de gentamicina cedido no se aumentó ni por el aumento de HPMC (10-20%) ni por el aumento del sulfato de gentamicina añadido a la formulación (4-8%) (ver Fig. 23b).

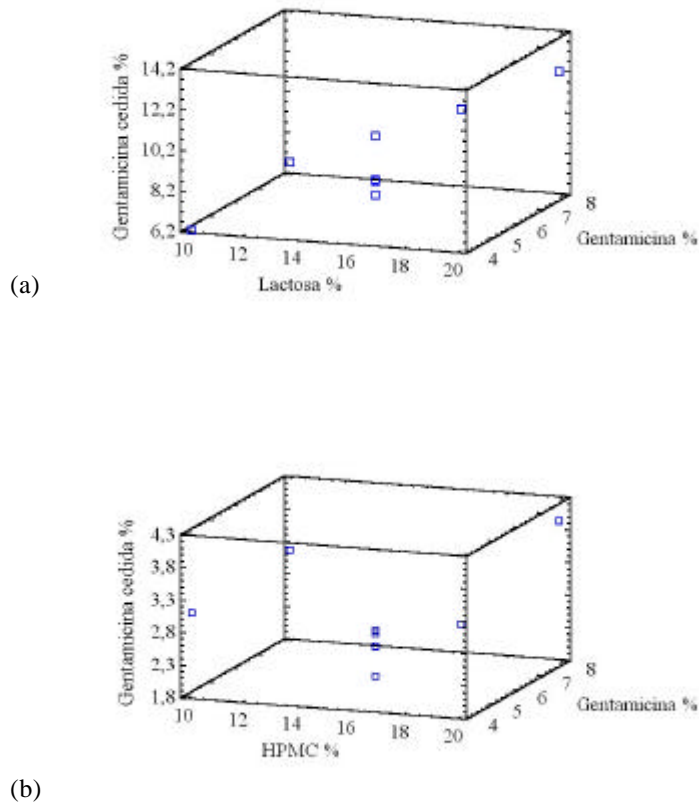


Figura 23. Diagramas de dispersión tridimensionales para la cesión del sulfato de gentamicina en función de los moduladores: (a) lactosa y (b) HPMC y de los porcentajes de sulfato de gentamicina incluidos en las formulaciones.

La precisión del método expresada como coeficiente de variación de la cantidad de sulfato de gentamicina cedida total acumulada correspondiente al punto central de los dos diseños fue 15,4% y 14% para las formulaciones con lactosa e HPMC, respectivamente. Este alto coeficiente de variación puede ser debido a la distribución errática de los poros y a las partículas de sulfato de gentamicina situadas en la superficie de los cementos.

Las Figs. 24 y 25 presentan los perfiles de cesión del sulfato de gentamicina desde los cementos modificados. Las Figs. 24a y 25a presentan el porcentaje de sulfato de gentamicina cedido en cada intervalo de tiempo. En estas figuras es posible observar que la máxima cantidad de sulfato de gentamicina se cedió en todos los casos en las primeras tomas de muestra. A partir de este tiempo, la cantidad de fármaco cedido disminuye significativamente de igual manera entre las diferentes muestras. En las Figs. 24b y 25b se representa la cantidad cedida acumulada del antibiótico. Los diferentes perfiles de cesión de las muestras se debieron a la diferencia en la cesión inicial que influye en el porcentaje total de fármaco cedido ya que las pendientes de la sección final

de los diferentes gráficos son muy similares. Este “burst” inicial se debió a la disolución de las partículas del fármaco presentes en la superficie del cemento.

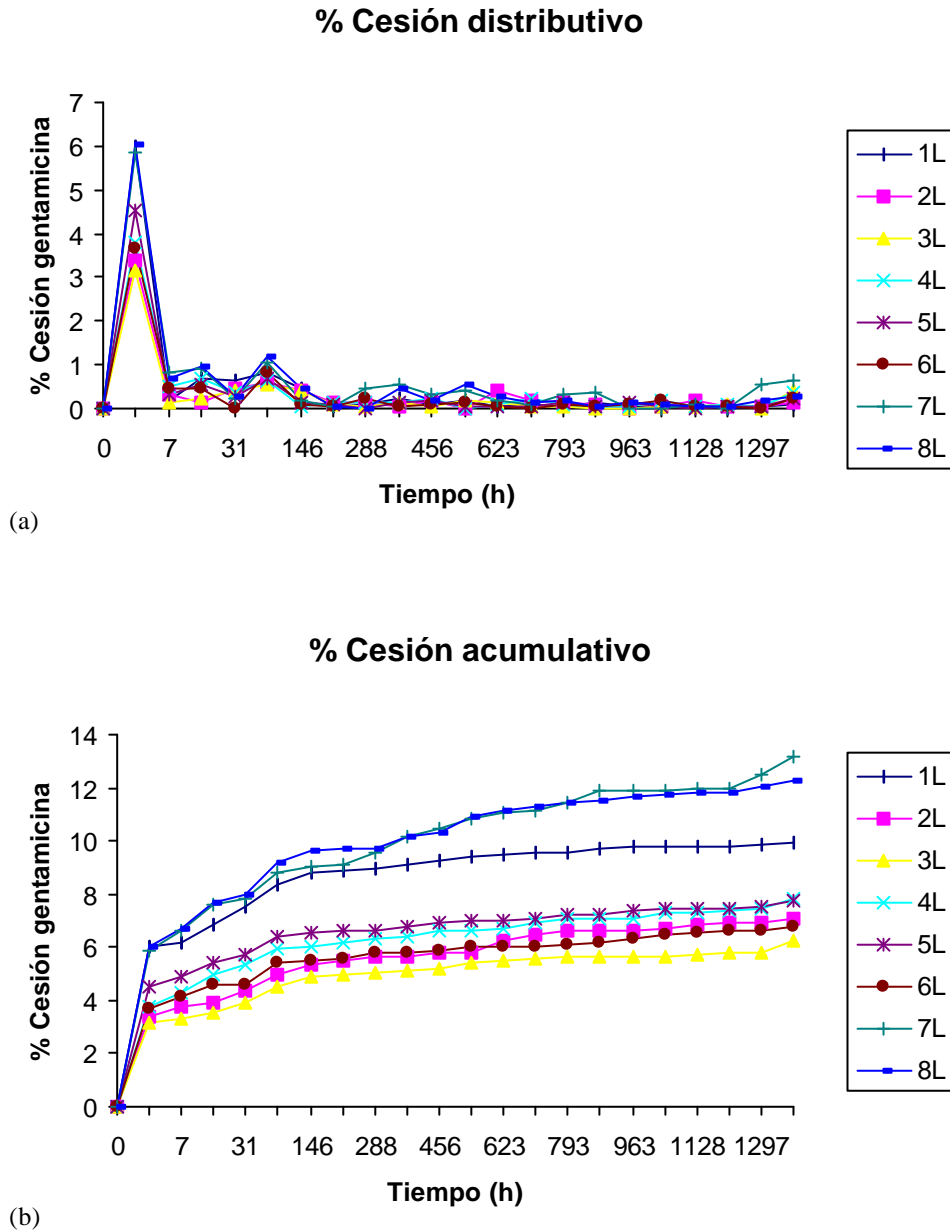


Figura 24. Porcentajes de cesión de sulfato de gentamicina distributivo (a) y acumulativo (b) desde cementos óseos acrílicos modificados con lactosa.

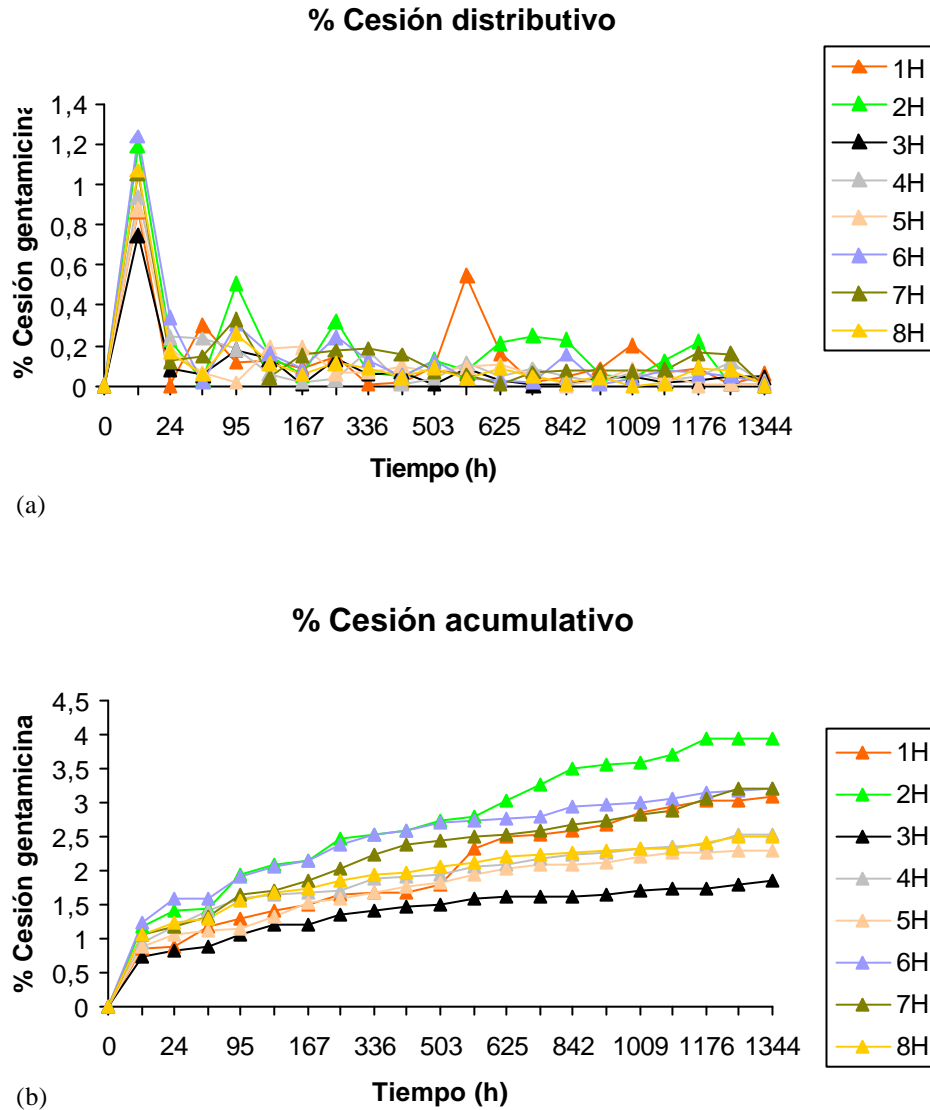
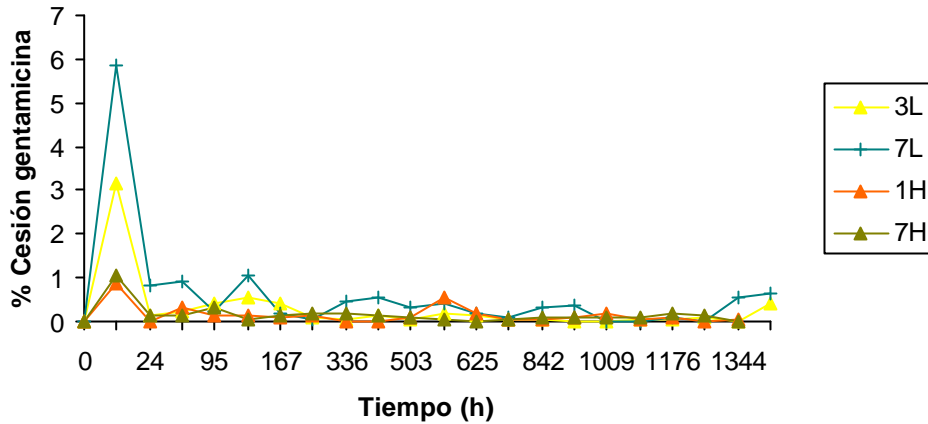


Figura 25. Porcentajes de cesión de sulfato de gentamicina distributivo (a) y acumulativo (b) desde cementos óseos acrílicos modificados con hidroxipropilmetilcelulosa.

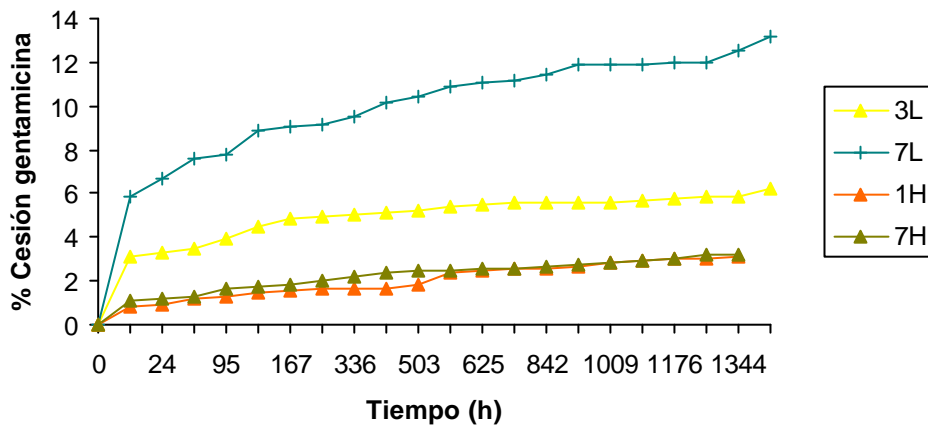
En la Fig. 26 se muestran los porcentajes distributivos (Fig. 26a) y acumulativos (Fig. 26b) de cesión de dos formulaciones de lactosa e HPMC, todas ellas con un 4% de gentamicina (ya que la inclusión del 8% no mejora la cesión de gentamicina) y con los porcentajes extremos de los moduladores (10-20%). Las formulaciones de HPMC presentan una menor cesión inicial que las de lactosa, y presentan similares valores de velocidad de cesión que la formulación 3L, mientras que la formulación 7L presenta no solo mayores cesiones iniciales sino también una mayor velocidad de cesión a lo largo del estudio, ver Fig. 26b lo que también se aprecia en unos mayores porcentajes distributivos (ver Fig. 26a).

% Cesión distributivo



(a)

% Cesión acumulativo



(b)

Figura 26. Porcentajes de cesión de sulfato de gentamicina distributivo (a) y acumulativo (b) desde los cementos óseos acrílicos modificados con lactosa y con hidroxipropilmetilcelulosa.

Por otra parte, la disolución de las partículas de lactosa incluidas en la superficie de los cementos modificados que contienen este agente modulador de la cesión, producen una matriz porosa como se observa en los estudios de SEM (Figs. 6 y 16) que permiten que el medio de disolución alcance a nuevas partículas de sulfato de gentamicina y las disuelva. Es por esto, que la cesión de sulfato de gentamicina desde la formulación 7L fue cuatro veces mayor si la comparamos con la cesión del cemento comercial CMW1[®] Gentamicina, como se puede ver en la Tabla 3.

A la vista de los resultados obtenidos en este ensayo de cesión se puede concluir que los cementos modificados con lactosa cedieron una mayor cantidad de sulfato de gentamicina que los cementos modificados con HPMC pero en ningún caso el cemento óseo acrílico permite una completa cesión del antibiótico porque el PMMA es un polímero altamente hidrofóbico.

2.3.3. POROSIDAD

Las Figs. 27 y 28 presentan las gráficas de volumen de intrusión acumulado de mercurio (cm^3/g) frente al diámetro de poro (μm) de las formulaciones con lactosa (Fig.27) y con HPMC (Fig.28) antes (Figs. 27a y 28a) y después (Figs. 27b y 28b) de ser sometidas al ensayo de disolución.

El volumen de intrusión de mercurio es una función de la porosidad total. Este volumen fue, en la mayoría de los casos, más bajo para las formulaciones ensayadas antes de los estudios de disolución que para las formulaciones ensayadas después (ver Figs. 27 y 28). Por lo tanto, los porcentajes de porosidad fueron siempre más altos en las formulaciones sometidas a los ensayos de disolución si las comparáramos a las formulaciones iniciales correspondientes.

La porosidad del cemento comercial CMW1[®] Gentamicina fue ligeramente menor antes que después de los ensayos de disolución (ver Figs. 27a y 27b). Como se puede apreciar en la Tabla 4 los valores de porosidad del cemento comercial con gentamicina antes y después de los estudios de disolución fueron respectivamente 5,58 y 6,05%, estas pequeñas diferencias se atribuyen a que las muestras analizadas no son los mismos especímenes debido a que la inclusión de mercurio en las muestras invalida su empleo en el estudio de disolución. Como es de esperar, el cemento comercial CMW1[®] Gentamicina fue menos poroso que los cementos modificados cuando la porosidad se determinó después de los estudios de cesión del fármaco (ver Figs. 27b y 28b).

En la Tabla 4 se observa que la porosidad de las formulaciones con lactosa antes de los ensayos de disolución disminuye a medida que aumenta el porcentaje de lactosa. Este hecho es probablemente debido al gran tamaño de estas partículas así como a la forma poliédrica, que puede favorecer el empaquetamiento de las mismas produciendo una porosidad menor. Sin embargo, los datos de porosidad de los cementos sometidos al ensayo de disolución presentaron una relación directa entre el aumento del porcentaje de lactosa y el aumento de porosidad, debido a la disolución de la lactosa y a la formación de una matriz porosa de cemento óseo. Este dato concuerda con lo observado mediante el microscopio electrónico de barrido en cuyas microfotografías se apreciaban claramente las oquedades producidas por la liberación de la lactosa que incluso dejan patentes la observación de hilos de PMMA (ver Figs. 13 y 14). Estos resultados también están de acuerdo con los estudios de cesión donde la cesión aumentaba en relación con el aumento de lactosa en las

formulaciones. Sin embargo, aunque el 20% de lactosa se añadió a algunas formulaciones, la porosidad no aumentó en la misma proporción, debido a que la lactosa puede quedar atrapada en los microespacios de la matriz polimérica que constituye el cemento acrílico.

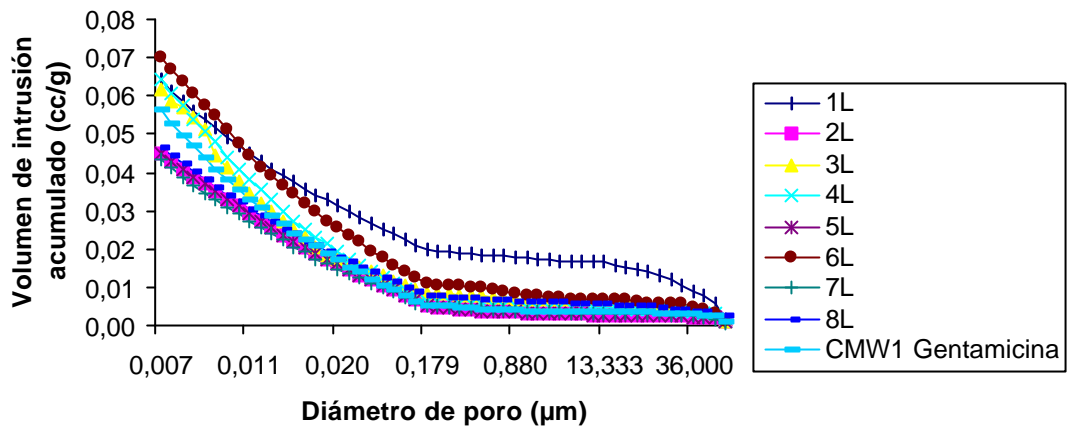
Las formulaciones con HPMC, antes y después de los estudios de disolución, presentaron una porosidad más alta que el resto de las formulaciones. Particularmente, la porosidad de las formulaciones de HPMC ensayadas antes de los estudios de disolución fue casi el doble que la porosidad del cemento comercial (ver Tabla 4). Este hecho se atribuye a que las formulaciones con HPMC presentan una superficie escamosa muy irregular de forma que las grietas que quedan entre estas estructuras escamosas provocan un considerable incremento de la porosidad, algo que es especialmente evidente en las formulaciones que contienen un 20% de HPMC tanto antes como después del ensayo de cesión. Sin embargo, estos valores altos de porosidad no produjeron un incremento en la cesión de sulfato de gentamicina, que fue similar a la cesión del cemento comercial (ver Tabla 3).

Tabla 4. Efectos del porcentaje de lactosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y sulfato de gentamicina en la porosidad de cementos óseos acrílicos modificados.

MUESTRA	PORCENTAJE LACTOSA (p/p) ^a	PORCENTAJE HPMC (p/p) ^a	PORCENTAJE GENTAMICINA (p/p) ^a	POROSIDAD. ANTES DE ESTUDIOS DISOLUCIÓN (%)	POROSIDAD. DESPUÉS DE ESTUDIOS DISOLUCIÓN (%)
1L	15	-	6	6,68	9,02
2L	15	-	6	6,70	9,08
3L	10	-	4	7,08	7,12
4L	15	-	6	6,72	8,97
5L	15	-	6	6,69	9,03
6L	10	-	8	7,30	8,68
7L	20	-	4	4,69	9,28
8L	20	-	8	5,06	9,97
1H	-	10	4	8,21	21,69
2H	-	20	8	13,79	22,48
3H	-	15	6	11,08	9,61
4H	-	15	6	11,12	9,19
5H	-	15	6	11,15	9,19
6H	-	10	8	8,11	18,25
7H	-	20	4	12,56	20,29
8H	-	15	6	11,09	10,00
CMW1 [®] G	-	-	4	5,58	6,05

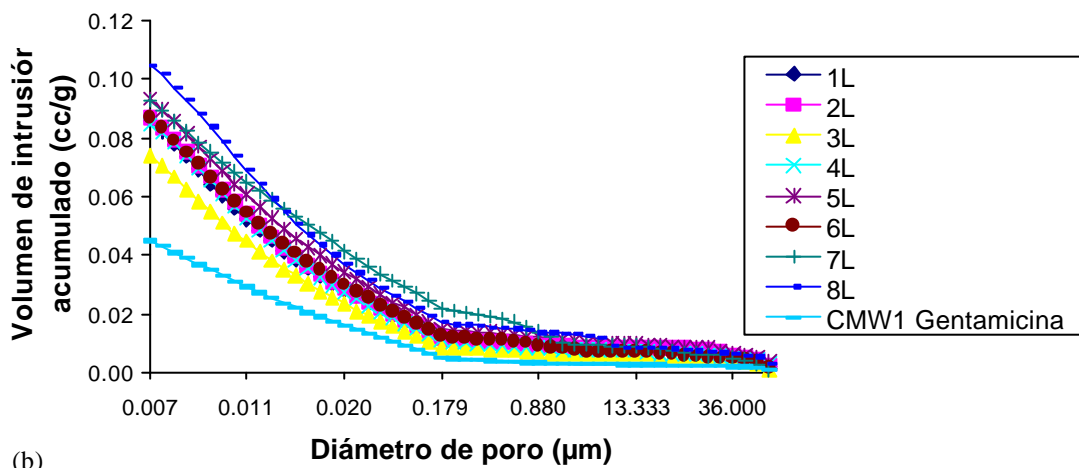
^a Porcentaje referido al componente en polvo del cemento.

Formulaciones no sometidas al ensayo de disolución



(a)

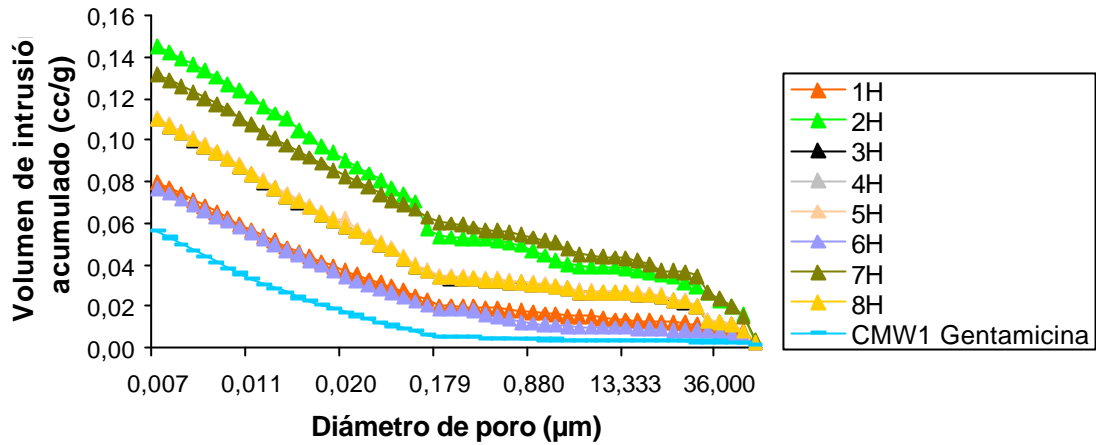
Formulaciones sometidas al ensayo de disolución



(b)

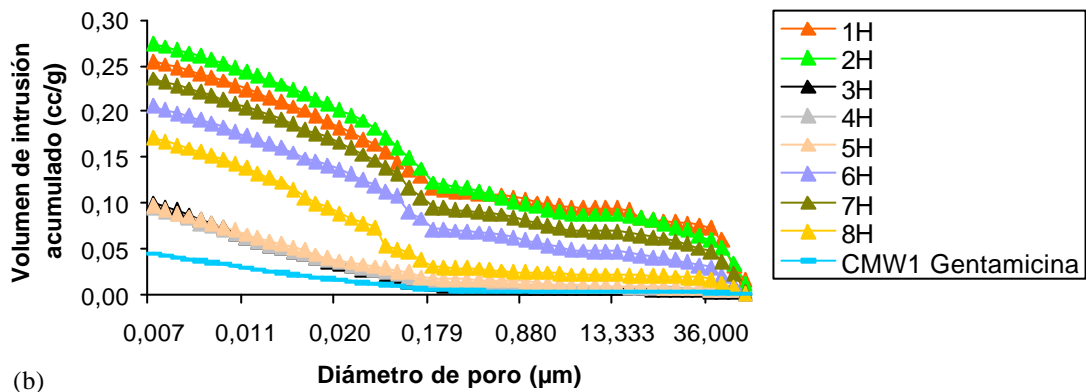
Figura 27. Volumen de intrusión acumulado de mercurio frente al diámetro de poro de cementos óseos modificados con lactosa ensayados antes (a) y después (b) de los estudios de disolución.

Formulaciones no sometidas al ensayo de disolución



(a)

Formulaciones sometidas al ensayo de disolución



(b)

Figura 28. Volumen de intrusión acumulado de mercurio frente al diámetro de poro de cementos óseos modificados con HPMC ensayados antes (a) y después (b) de los estudios de disolución.

2.4. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams K, Couch L, Cierny G, Calhoun J, Mader JT. In vitro and in vivo evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads. *Clin Orthop Rel Res* 1992;276:244-252.
2. Díez-Peña E, Frutos G, Frutos P, Barrales-Rienda JM. Gentamicin sulphate release from a modified commercial acrylic surgical radiopaque bone cement. I. Influence of the gentamicin concentration on the release process mechanism. *Chem Pharm Bull* 2002; 50(9):1201-1208.
3. Elson RA, Jephcott AE, McGeghie DB, Verettas D. Antibiotic - loaded acrylic cement. *J Bone Jt Surg* 1977;59:200-205.
4. Frutos P, Torrado S, Perez ME, Frutos G. Validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. *J Pharm Biomed Anal* 2000;a;21:1149-1159.
5. Frutos P, Díez E, Barrales-Rienda JM, Frutos G. Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release. *Int J Pharm* 2000;b;209:15-26.
6. Gerhart TN, Roux RD, Hanff PA, Horowitz GL, Renshaw AA, Hayes WC. Antibiotic-loaded biodegradable bone cement for prophylaxis and treatment of experimental osteomyelitis in rats. *J Orthop Res* 1993;11:250-255.
7. Hill J, Klenerman L, Trustey S, Blowers R. Diffusion of antibiotics from acrylic bone-cement in vitro. *J Bone Jt Surg* 1977;59B:197-199.
8. Holm NJ, Vejlsgaard R. The in vitro elution of gentamicin sulphate from methylmethacrylate bone. A comparative study. *Acta Orthop Scand* 1976;47:144-148.
9. Joschek S, Nies B, Krotz R, Göpferich A. Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. *Biomaterials* 2000;21:1645-1658.
10. Lewis G. Properties of acrylic bone cement: state of the art review. *J Biomed Mater Res* 1997;38:155-182.
11. Masri BA, Duncan CP, Beauchamp CP. Effect of varying surface patterns on antibiotic elution from antibiotic loaded bone cement. *J Arthrop* 1995;10:453-459.
12. Mehta KA, Serpil M, Phuapradit W, Waseem A, Shah NH. Effect of formulation and process variables on porosity parameters and release rates from a multi unit erosion matrix of a poorly soluble drug. *J Control Release* 2000;63:201-211.
13. Park JB, Lakes RS. *Polymeric implant materials. Biomaterials. An introduction.* New York: Plenum Press, 1992. p. 141-144.

14. Penner MJ, Duncan CP, Bassam AM. The in vitro elution characteristics of antibiotic-loaded CMW and Palacos-R bone cements. *J Arthrop* 1999;14:209-214.
15. Sampath S, Robinson D. Comparison of new and existing spectrofotometric methods for the analysis of tobramycin and other aminoglycosides. *J Pharm Sci* 1990;79:428-431.
16. Torrado S, Frutos P, Frutos G. Gentamicin bone cements: characterisation and release (in vitro and in vivo assays). *Int J Pharm* 2001;217:57-69.
17. Trippel SB. Current concepts review antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty. *J Bone Jt Surg* 1986;68:1297-1302.
18. Tunney MM, Jones DS, Gorman SP. Methacrylate polymers and copolymers as urinary tract biomaterials: resistance to encrustation and microbial adhesion. *Int J Pharm* 1997;151:121-126.
19. United States Pharmacopeia 26. United States Pharmacopeial convention. Rockville, 2003.
20. Van de Belt H, Neut D, Uges DRA, Schenk W, Van Horn JR, Van der Mei HC, Busscher HJ. Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release. *Biomaterials* 2000;21:1981-1987.
21. Virto MR, Frutos P, Torrado S, Frutos G. Gentamicin release from modified acrylic bone cements with lactose and hydroxypropylmethylcellulose. *Biomaterials* 2003;24:79-87.
22. Wahling H, Dingeldein E. Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthop Scand* 1980;51:49-56.
23. Welch AB. Antibiotics in acrylic bone cement. In vitro studies. *J Biomed Mater Res* 1978;12:679-700.
24. Zhang X, Wyss UP, Pichora D, Goosen MFA. Biodegradable controlled antibiotic release devices for osteomyelitis: optimization of release properties. *J Pharm Pharmacol* 1994;46:718-724.

3. INFLUENCIA DE MODULADORES DE CESIÓN EN LAS PROPIEDADES TÉRMICAS Y CRISTALINIDAD DE CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS

3.1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los polímeros sintéticos de cadena larga muestran una secuencia de cambios característicos al ser calentados. Los polímeros parcialmente cristalinos pueden sufrir una transformación sólido-líquido (fusión) parecida a la que experimentan las especies cristalinas moleculares cuando se hace variar la temperatura. Esta variación puede ponerse de manifiesto por técnicas tales como la medida del volumen específico. Esta fusión, será función de las posibles interacciones presentes en el cristal entre macromoléculas cercanas, que a su vez serán función de los grupos químicos presentes. En general, estas fuerzas podrán ser del tipo de Van der Waals, interacciones electrostáticas o incluso puentes de hidrógeno. Hay que señalar que en la fusión no hay roturas de enlaces covalentes, es decir, no aumenta la heterogeneidad del polímero (Sanz Pedrero, 1992).

El paso del estado sólido-líquido es una transición de primer orden. Sin embargo, si el polímero es semicristalino o amorfo, presenta por debajo del punto de fusión T_f y dentro de un pequeño intervalo de temperatura (T_g-T_f), una variación anormalmente rápida de muchas propiedades físicas, como pueden ser el volumen específico, la viscosidad, el coeficiente de dilatación térmica o capacidad calorífica en un pequeño intervalo de temperatura. A esta transición se le denomina *transición vítrea*, y a la temperatura a la que se produce, T_g , *temperatura de transición vítrea*.

La variación de propiedades físicas convierte al polímero en duro, y sobre todo quebradizo por debajo de T_g , mientras que por encima puede presentar altas elasticidades si el polímero es amorfo, o propiedades plásticas si es cristalino. La determinación de la transición será, por tanto, de un gran interés industrial, ya que su conocimiento será importante para la utilización de un determinado polímero en un intervalo dado de temperaturas (Kuo y col., 2003).

Actualmente la temperatura de transición vítrea, el punto de fusión y la temperatura de descomposición de los polímeros pueden determinarse experimentalmente mediante una técnica de interferometría óptica, obteniéndose resultados similares a los obtenidos mediante DSC (Diakoumakos y Raptis, 2003).

El valor de la temperatura de transición vítrea es una función muy importante de la velocidad a la que se enfría (o calienta) el polímero, es decir el fenómeno tiene al menos una componente cinética. Podría pensarse que dicha transición tendría su origen en variaciones de la

cristalinidad del polímero. Sin embargo, estudios de rayos X demuestran que la idea no es correcta. Hoy en día se considera que T_g está relacionada con las zonas amorfas del polímero, más concretamente, está relacionada con la modificación de los grados de libertad de las cadenas macromoleculares en las partes amorfas del polímero (Reyes e Hinojosa, 2000). A temperaturas bajas, las macromoléculas se encuentran muy próximas y no existe prácticamente libertad de movimiento, o al menos se encuentra muy restringida. A medida que la temperatura aumenta, aumentan las amplitudes de las vibraciones y se producen deformaciones locales como consecuencia de un cambio de los grados de libertad de rotación de las distintas unidades monoméricas, que, son función de la constitución del polímero (Sanz Pedrero, 1992).

Por encima de la temperatura de transición, el gran aumento de los grados de libertad da lugar a la manifestación de nuevos fenómenos que se traducen en un aumento de la elasticidad en polímeros amorfos (elastómeros), atribuible a la variación de los ángulos de rotación interna del polímero. En cambio, existe aumento de la plasticidad en polímeros semicristalinos (termoplásticos), debido sobre todo a la posibilidad del movimiento relativo de unas cadenas de polímero con respecto a otras. Si se continúa incrementando la temperatura del polímero, alcanzaremos la fusión del mismo. En resumen, para que un polímero sea elástico debe ser amorfo y su T_g debe estar por debajo de la temperatura ambiente. Si se precisa un polímero plástico, su T_g debe estar por debajo de su punto de fusión (Sanz Pedrero, 1992).

Una técnica muy utilizada para medir experimentalmente el efecto térmico que acompaña a las transformaciones físicas o químicas que sufre una muestra en función de la temperatura es la calorimetría.

Los cambios energéticos de la muestra son debidos a transiciones o reacciones endotérmicas o exotérmicas que están ocasionadas por cambios de fase, fusión, inversión de estructuras cristalinas, sublimación y vaporización, reacciones de deshidratación, reacciones de disociación o descomposición, reacciones de oxidación y reducción, etc. Generalmente los procesos de fusión, vaporización y sublimación, reacciones de deshidratación y reducción, así como determinadas reacciones de descomposición producen efectos endotérmicos, mientras que la cristalización, oxidación y algunas reacciones de descomposición producen efectos exotérmicos (Willard y col., 1991).

Los equipos comerciales utilizados para el análisis térmico son del tipo DTA (Análisis térmico diferencial) y DSC (Calorimetría de barrido diferencial). Ambos ponen de manifiesto los cambios energéticos que sufre una muestra determinada cuando se la somete a un programa controlado de temperatura, el DTA mide la diferencia de temperaturas entre la muestra y la referencia mientras que el DSC mide los cambios de flujo de calor debido a una transformación de

la muestra respecto a una referencia (Oriol y del Castillo, 1985). El equipo utilizado en este trabajo es del tipo *calorimetría diferencial programada, con sistema de flujo de calor*. Una celda típica de este equipo usa un disco termoeléctrico de *constantán* (aleación con 60% de cobre y 40% de níquel) como el medio primario para transferir calor a las posiciones de la muestra y la referencia, y también como un elemento de la unión termoeléctrica sensora de la temperatura. La muestra y una referencia se colocan en dos moldes que se asientan sobre el disco en dos plataformas elevadas. A través de éste se transfiere calor a la muestra y a la referencia. El flujo diferencial de calor hacia la muestra y la referencia se monitorizan mediante termopares de *cromel* (90% de níquel y 10% de cromo) - *constantán* formados por la unión del disco de *constantán* y el recubrimiento fino *cromel* al lado inferior de cada plataforma. Los alambres de *cromel* y *alumel* (94% de níquel, 3% de manganeso, 2% de aluminio y 1% de silicio) que se encuentran conectados al lado inferior de la recubierta fina de *cromel* forman un termopar *cromel-alumel*, que sirve para monitorizar la temperatura de la muestra (Fig.1) (Skoog y col., 2000). Una sensibilidad calorimétrica constante se establece mediante un programa de cómputo que mantiene lineal el coeficiente de calibración de la celda. La calorimetría diferencial programada con sistema de flujo de calor proporciona una exactitud calorimétrica máxima desde $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $750\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los pesos de muestra varían entre 0,1 y 100 mg. (Willard y col., 1991).

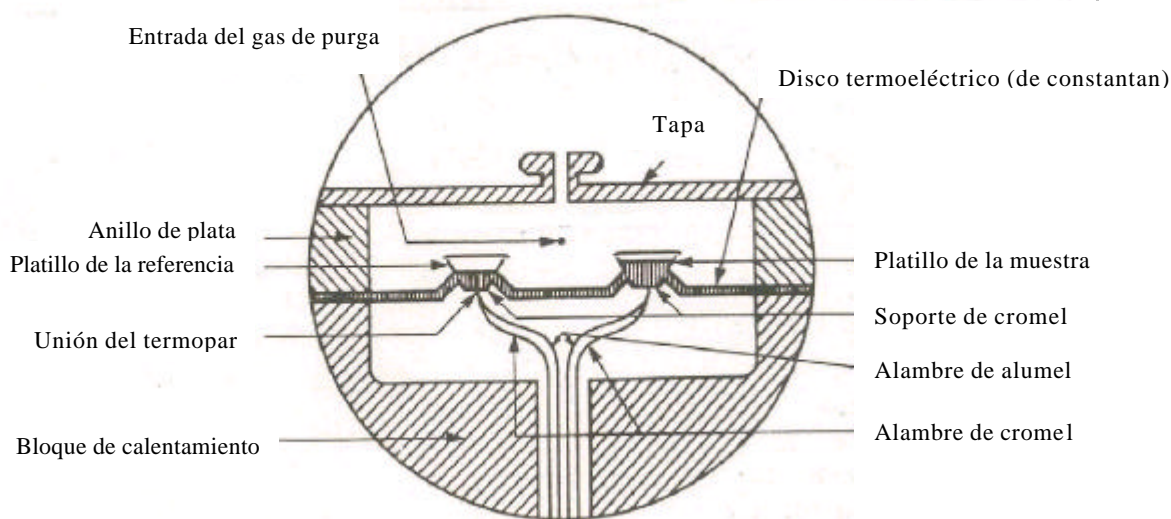


Figura 1. Esquema de una celda de DSC de flujo de calor.

El cambio de entalpía, DH , de la muestra es igual a la diferencia entre el flujo de calor hacia o desde la muestra, Q_s , y el flujo de calor hacia o desde el material de referencia, Q_r :

$$DH = Q_s - Q_r$$

De acuerdo con la analogía térmica de la ley de Ohm,

$$Q = \frac{T_2 - T_1}{R_{th}}$$

El flujo de calor es proporcional a la fuerza impulsora (la diferencia de temperatura entre las temperaturas T_2 y T_1) e inversamente proporcional a la resistencia térmica R_{th} . Combinando las relaciones anteriores se obtiene

$$DH = Q_s - Q_r = \frac{T_c - T_s}{R_{th}} - \frac{T_c - T_r}{R_{th}}$$

donde T_c es una temperatura constante externa a la muestra y a la referencia, T_s es la temperatura de la muestra, y T_r es la temperatura de referencia. El sistema está diseñado de manera que los dos valores de T_c y los dos valores de R_{th} son idénticos. Por tanto la ecuación se reduce a

$$DH = - \frac{T_s - T_r}{R_{th}}$$

La señal medida es la tensión del termopar, que es proporcional a la diferencia de temperatura, ($T_s - T_r$).

La integración del área bajo la curva DSC proporciona una medida directa de DH para las transiciones térmicamente inducidas de acuerdo con la ecuación.

$$A = - k' m DH$$

donde A es el área de integración; k' , la constante del instrumento, la cual es independiente de la temperatura; m , es la masa; y DH la entalpía de la reacción o transición.

En general, cada sustancia da una curva de DSC en la que el número, forma y posición de las endotérmicas y exotérmicas, sirven como medio para identificar cualitativamente una sustancia. El punto de inicio del cambio de fase o de la reacción química es el punto en el que la curva comienza a desviarse respecto de la línea base. Cuando la transición es completa, la difusión térmica permite un regreso rápido de la muestra al equilibrio. La temperatura del pico indica la temperatura a la cual se realiza cuantitativamente la reacción o la transición. Una endoterma amplia indica un cambio lento en la capacidad. Una transición de “segundo orden o vítrea”, observada como un desplazamiento de la línea base indica una disminución en el orden dentro del sistema. Un comportamiento exotérmico (sin descomposición) se asocia a la disminución de la entalpía de una fase o de un sistema químico (Willard y col., 1991).

Los métodos térmicos diferenciales están indicados en la determinación de:

- Temperatura y calor de fusión
- Temperatura y calor de cristalización
- Temperatura y calor de descomposición u oxidación
- Compatibilidad de productos
- Capacidad calorífica
- Análisis de pureza
- Cálculo de cinéticas

Para el estudio de la cristalinidad de las formulaciones y de los componentes de dichas formulaciones se usa la técnica de difracción de rayos X.

La difracción de rayos X es una técnica muy usada para la identificación de fases sólidas y para la identificación de diferentes formas polimórficas de un compuesto. Esta técnica se puede usar también para identificar las formas solvatadas y anhidras de un compuesto (Suryanarayanan, 1995).

Al igual que con los otros tipos de radiación electromagnética, la interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa da lugar a una dispersión. Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un cristal, tienen lugar interferencias (tanto constructivas como destructivas) entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación. El resultado es la difracción.

Cuando un haz de rayos X choca contra la superficie de un cristal formando un ángulo θ , una porción del haz es dispersada por la capa de átomos de la superficie. La porción no dispersada del haz penetra en la segunda capa de átomos donde, de nuevo, una fracción es dispersada y la que queda pasa a la tercera capa. El efecto acumulativo de esta dispersión producida por los centros regularmente espaciados del cristal es la difracción del haz. Los requisitos para la difracción de rayos X son: (1) que el espaciado entre las capas de átomos sea aproximadamente el mismo que la longitud de onda de la radiación y (2) que los centros de dispersión estén distribuidos en el espacio de manera muy regular.

En 1912, W. L. Bragg estudió la difracción de rayos X por cristales (Fig. 2). En este caso, un haz estrecho de radiación choca contra la superficie del cristal formando un ángulo θ ; la dispersión tiene lugar como consecuencia de la interacción de la radiación con los átomos localizados en O , P y R . Si la distancia

$$AP + PC = n\lambda$$

donde n es un número entero, la radiación dispersada estará en fase en OCD y el cristal parecerá reflejar la radiación X. Pero

$$AP = PC = d \operatorname{sen} \theta$$

donde d es la distancia interplanar del cristal. Así se puede escribir que las condiciones para que tenga lugar una interferencia constructiva del haz que forma un ángulo θ con la superficie del cristal, son

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta$$

Esta ecuación se llama *ecuación de Bragg*. Hay que señalar que los rayos X son reflejados por el cristal sólo si el ángulo de incidencia satisface la condición

$$\operatorname{sen} \theta = \frac{n\lambda}{2d}$$

Para todos los demás ángulos, tienen lugar interferencias destructivas (Skoog y col., 2000).

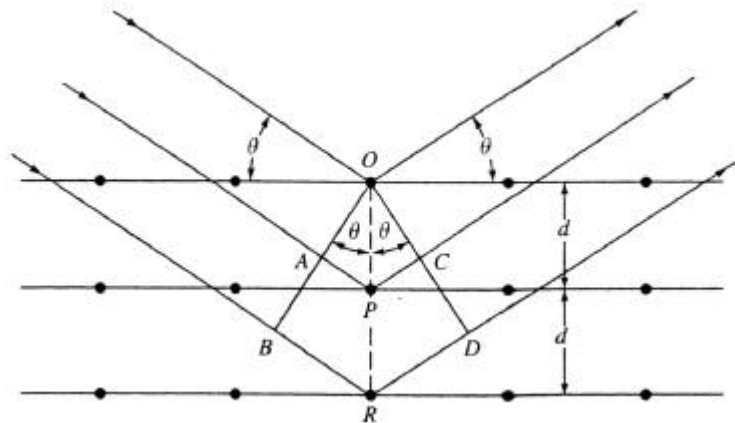


Figura 2. Difracción de rayos X producida por un cristal.

En este trabajo, se ha utilizado la calorimetría diferencial de barrido y la difracción de rayos-X para estudiar de compatibilidad entre los cementos óseos acrílicos de polimetilmetacrilato (PMMA), dos moduladores de la cesión, lactosa monohidrato y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y el antibiótico sulfato de gentamicina.

3.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.2.1. MATERIALES

Para el estudio de las propiedades térmicas y la cristalinidad de nuestros sistemas se emplearon muestras de cementos con distinta composición de moduladores de la cesión y antibiótico y se prepararon como se describió en el capítulo anterior.

3.2.2. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Las medidas de DSC se llevaron a cabo empleando un calorímetro diferencial de barrido Mettler-Toledo 820 (Mettler Toledo, Suiza) conectado a un sistema de enfriamiento que funciona con nitrógeno líquido. La escala de temperatura se calibró usando las temperaturas de fusión del indio y del zinc. Para realizar el ensayo se emplearon cápsulas de aluminio selladas y con un agujero en la tapa como la de referencia y las muestras pesaron aproximadamente 5,0 mg. Todas las muestras se calentaron y enfriaron a una velocidad de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno, la mayoría de ellas sufrieron un segundo calentamiento manteniendo la misma velocidad. Se empleó el DSC para distintas determinaciones, tal y como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Determinaciones realizadas en el DSC.

MUESTRA	COMPOSICION	PESO (mg)
G	Sulfato de Gentamicina	5,8
L	Lactosa monohidrato	5,5
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa	5,1
CMW1 [®] RP	CMW1 [®] Radiopaco (polvo)	5,0
CMW1 [®] GP	CMW1 [®] Gentamicina (polvo)	5,3
CMW1 [®] RC	CMW1 [®] Radiopaco (cemento)	5,8
CMW1 [®] GC	CMW1 [®] Gentamicina (cemento)	5,9
CMW1 [®] GC E ^a	CMW1 [®] Gentamicina (cemento)E ^a	5,3
Formulación 10L4G	10% lactosa, 4% gentamicina	5,4
Formulación 10L4G E ^a	10% lactosa, 4% gentamicina E ^a	5,8
Formulación 10L8G	10% lactosa, 8% gentamicina	5,2
Formulación 10L8G E ^a	10% lactosa, 8% gentamicina E ^a	5,1
Formulación 20L4G	20% lactosa, 4% gentamicina	5,3
Formulación 20L4G E ^a	20% lactosa, 4% gentamicina E ^a	5,2
Formulación 20L8G	20% lactosa, 8% gentamicina	5,6
Formulación 20L8G E ^a	20% lactosa, 8% gentamicina E ^a	5,5
Formulación 10H4G	10% HPMC, 4% gentamicina	5,2
Formulación 10H4G E ^a	10% HPMC, 4% gentamicina E ^a	5,8
Formulación 10H8G	10% HPMC, 8% gentamicina	5,9
Formulación 10H8G E ^a	10% HPMC, 8% gentamicina E ^a	5,6
Formulación 20H4G	20% HPMC, 4% gentamicina	5,0
Formulación 20H4G E ^a	20% HPMC, 4% gentamicina E ^a	5,4
Formulación 20H8G	20% HPMC, 8% gentamicina	5,5
Formulación 20H8G E ^a	20% HPMC, 8% gentamicina E ^a	5,8

^a DSC realizado después de los ensayos de cesión.

3.2.3. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Los estudios de difracción de rayos X se realizaron con un difractómetro Philips X'Pert-MPD PW3050 (CAI, difracción de rayos X, UCM). Las distintas muestras son expuestas a una radiación Cu K α monocromatizada. Se exploró la zona comprendida entre 5°-50°2 θ ; tamaño de paso 0,04° (2 θ) y tiempos de conteo 1 segundo por paso.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

En las Tablas 2, 3 y 4, se recogen todos los parámetros térmicos de las distintas formulaciones estudiadas.

Tabla 2. Determinaciones realizadas en el DSC para los componentes de las formulaciones y los cementos comerciales.

MUESTRA	ENDOTERMA DE DESHIDRATACIÓN (°C)			ENDOTERMA DE FUSION (°C)			T _g (°C)		DH _{fusión-descomposición} (J/g)
	ONSET	PICO	ENDSET	ONSET	PICO	ENDSET	ONSET	PUNTO MEDIO	
G	62,94	105,33	149,23	237,61	244,00	247,71	—	—	-12,63
L	141,40	147,67	153,73	216,43	221,50	224,29	—	—	-125,77
HPMC	26,29	70,17	100,97	—	—	—	161,07	162,24	—
CMW1 [®] RP	—	—	—	226,03	262,60	287,98	109,92	115,58	-57,58
CMW1 [®] GP	—	—	—	214,70	262,60	287,98	92,92	112,75	-52,50
CMW1 [®] RC	—	—	—	316,15	372,64	397,09	93,95	109,27	-694,70
CMW1 [®] GC	—	—	—	239,58G ^b 319,98C ^c	251,06G ^b 372,64C ^c	258,72G ^b 400,92C ^c	97,78	113,10	-1,58G ^b -713,38C ^c
CMW1 [®] GCE ^a	—	—	—	316,15	372,64	376,55	101,61	116,93	-98,14

^a DSC realizado después de los ensayos de cesión. ^b Dato procedente de la fusión-descomposición de la gentamicina. ^c Dato procedente de la fusión-descomposición del cemento.

Tabla 3. Determinaciones realizadas en el DSC para las formulaciones con lactosa y gentamicina.

MUESTRA	ENDOTERMA DE DESHIDRATACIÓN (°C)			ENDOTERMA DE FUSIÓN (°C)			T _g (°C)		DH _{fusión-descomposición} (J/g)
	ONSET	PICO	ENDSET	ONSET	PICO	ENDSET	ONSET	PUNTO MEDIO	
Formulación 10L4G	144,94	147,75	151,14	205,18L ^b 243,51G ^c 262,68C ^d	216,65L ^b 251,18G ^c 361,84C ^d	224,34L ^b 255,01G ^c 397,19C ^d	105,51	117,00	-2,04L ^b -0,18G ^c -288,38C ^d
Formulación 10L4G E ^a	142,38	148,33	153,79	195,99L ^b 292,69C ^d	209,12L ^b 351,95C ^d	227,07L ^b 379,35C ^d	102,58	112,03	-0,98L ^b -179,59C ^d
Formulación 10L8G	142,81	147,25	152,15	205,18L ^b 239,68G ^c 316,20C ^d	212,83L ^b 247,34G ^c 361,84C ^d	220,49L ^b 255,01G ^c 395,75C ^d	109,34	117,00	-2,11L ^b -0,84G ^c -230,30C ^d
Formulación 10L8G E ^a	142,44	147,33	151,94	199,27L ^b 273,20C ^d	213,36L ^b 375,69C ^d	225,91L ^b 396,72C ^d	102,58	113,77	-0,84L ^b -345,88C ^d
Formulación 20L4G	142,63	149,17	154,56	201,35L ^b 243,51G ^c 312,39C ^d	216,65L ^b 251,18G ^c 369,52C ^d	228,18L ^b 258,85G ^c 393,37C ^d	97,84	109,34	-7,70L ^b -0,17G ^c -187,17C ^d
Formulación 20L4G E ^a	145,43	155,00	160,73	190,78L ^b 291,53C ^d	214,52L ^b 370,28C ^d	229,19L ^b 397,69C ^d	106,82	116,28	-4,95L ^b -298,85C ^d
Formulación 20L8G	142,15	147,33	152,94	192,90L ^b 243,28G ^c 315,85C ^d	216,45L ^b 248,11G ^c 365,65C ^d	224,94L ^b 253,90G ^c 383,99C ^d	103,15	113,58	-7,64L ^b -0,85G ^c -182,60C ^d
Formulación 20L8G E ^a	146,39	152,00	158,61	182,87L ^b 295,20C ^d	213,36L ^b 370,30C ^d	227,07L ^b 397,11C ^d	104,70	112,42	-4,00L ^b -298,88C ^d

^a DSC realizado después de los ensayos de cesión. ^b Dato procedente de la fusión-descomposición de la lactosa monohidrato. ^c Dato procedente de la fusión-descomposición de la gentamicina. ^d Dato procedente de la fusión-descomposición del cemento.

Tabla 4. Determinaciones realizadas en el DSC para las formulaciones con HPMC y gentamicina.

MUESTRA	ENDOTERMA DE FUSION (°C)			T _g (°C)		DH _{fusión-descomposición} (J/g)
	ONSET	PICO	ENDSET	ONSET	PUNTO MEDIO	
Formulación 10H4G	243,12G ^c	247,31G ^c	254,98G ^c	109,33C ^d 178,33H ^e	116,99C ^d 185,99H ^e	-0,13G ^c
Formulación 10H4G E ^a	—	—	—	91,17C ^d 163,95H ^e	102,38C ^d 168,20H ^e	—
Formulación 10H8G	241,18G ^c	251,19G ^c	260,65G ^c	101,66C ^d 178,33H ^e	113,16C ^d 182,16H ^e	-0,26G ^c
Formulación 10H8G E ^a	—	—	—	102,58C ^d 165,69H ^e	109,91C ^d 170,32H ^e	—
Formulación 20H4G	243,48G ^c	247,31G ^c	251,15G ^c	105,49C ^d 164,72H ^e	113,16C ^d 168,59H ^e	-0,10G ^c
Formulación 20H4G E ^a	—	—	—	98,72C ^d 162,79H ^e	105,47C ^d 169,16H ^e	—
Formulación 20H8G	243,47G ^c	251,19G ^c	255,63G ^c	105,08C ^d 176,50H ^e	115,51C ^d 183,83H ^e	-0,31G ^c
Formulación 20H8G E ^a	—	—	—	107,59C ^d 173,80H ^e	115,51C ^d 179,59H ^e	—

^a DSC realizado después de los ensayos de cesión. ^c Dato procedente de la fusión-descomposición de la gentamicina. ^d T_g del cemento. ^e T_g de la Hidroxipropilmetilcelulosa.

La Fig. 3 muestra la curva de DSC para el sulfato de gentamicina en las condiciones indicadas en materiales y métodos. En dicha curva se observa un pico endotérmico amplio a 105,33 °C correspondiente a pérdida de agua y un pico a 244 °C, correspondiente a la fusión y descomposición de dicho fármaco. Este dato coincide con la bibliografía (Rosenkrantz y col., 1980), (Merck Index, 1996).

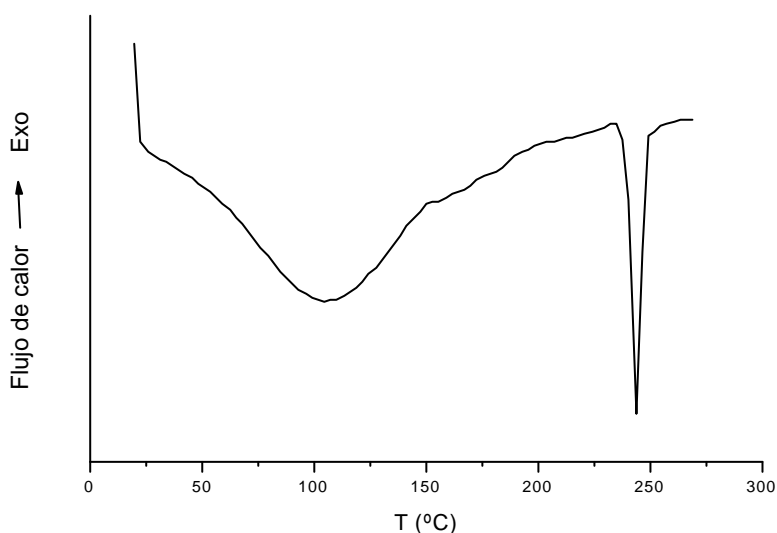


Figura 3. Curva de DSC del sulfato de gentamicina.

La lactosa es uno de los excipientes más utilizados en farmacia que se emplea como diluyente en comprimidos y cápsulas así como agente transportador en las formulaciones de los inhaladores de polvo seco. Existen diferentes variedades comerciales de lactosa para facilitar su empleo en distintas aplicaciones como puedan ser la obtención de comprimidos con granulación vía húmeda previa o por compresión directa (Angberg, 1995).

La lactosa es un disacárido compuesto de galactosa y glucosa, que existe en dos formas isómericas ópticas α y β lactosa. En solución acuosa las moléculas de lactosa sufren una mutorotación hasta alcanzar un equilibrio que consiste en un 38% de la forma α y un 62% de la forma β (Lerk y col., 1983). Las formas cristalinas de α y β lactosa difieren en sus propiedades físicas de forma que presentan diferentes valores de densidad, solubilidad y punto de fusión. (Chidavaenzi y col., 1997), (Angberg, 1995).

La forma β no existe en forma de monohidrato (Berlin y col., 1970), (Berlin y col., 1971). Esta lactosa anhidra es un polimorfo estable cuyo punto de fusión y descomposición se encuentra recogido en la bibliografía entre 230 °C y 235 °C (Figura, 1993), (Berlin y col., 1971), (Angberg, 1995). Esta forma β puede encontrarse también en una forma vítrea, estable a bajas humedades relativas y es importante destacar que es una forma higroscópica bajo condiciones ambientales de alta humedad.

La forma α - lactosa a su vez puede encontrarse en tres formas diferentes. La forma α_s - lactosa es una forma anhidra estable cuyo DSC no presenta pico de deshidratación a 150 °C y sin embargo presenta un pico endotérmico entre 211-224 °C que corresponde al pico de fusión y descomposición. La forma α_H - lactosa es una forma anhidra higroscópica que puede absorber hasta un 5% de agua, y cuya curva de DSC tampoco presenta el pico de deshidratación a 150 °C y se caracteriza por la presencia de un pico exotérmico alrededor de 170 °C producido por la recristalización (distorsiones de red) y un pico endotérmico de fusión y descomposición por encima de 200 °C (Figura, 1993). La forma α - lactosa monohidrato presenta una curva de DSC con un pico endotérmico de deshidratación entre 143-152 °C (Giron y col., 1989), (Figura, 1993), (Chidavaenzi y col., 1997) y un pico endotérmico de fusión, descomposición entre 204-223 °C (Chidavaenzi y col., 1997), (Figura, 1993), (Giron y col., 1989), (Berlin y col., 1971). Esta gran dispersión en la medida por DSC del punto de fusión correspondiente a α - lactosa monohidrato obtenido por diversos autores se debe fundamentalmente a que: i) la lactosa comercial utilizada no es pura, ii) la α - lactosa monohidrato es muy sensible a la forma de encapsular la muestra en los contenedores y iii) tratamientos previos y variaciones en las variables de diseño. Según algunos autores (Chidavaenzi y col., 1997) el pico de fusión no corresponde a una especie única sino que representa la fusión de la mezcla de varias formas polimórficas de lactosa. Debido a que el grado

de pureza de la muestra utilizada no es del 100% puede existir un porcentaje pequeño y estable de β -lactosa anhidra y adicionalmente alguna forma vítrea estable para humedades bajas pero higroscópica para humedades altas (Angberg, 1995).

En la Fig. 4 se muestran las curvas de DSC de los diferentes tipos de lactosa recogidas en la bibliografía.

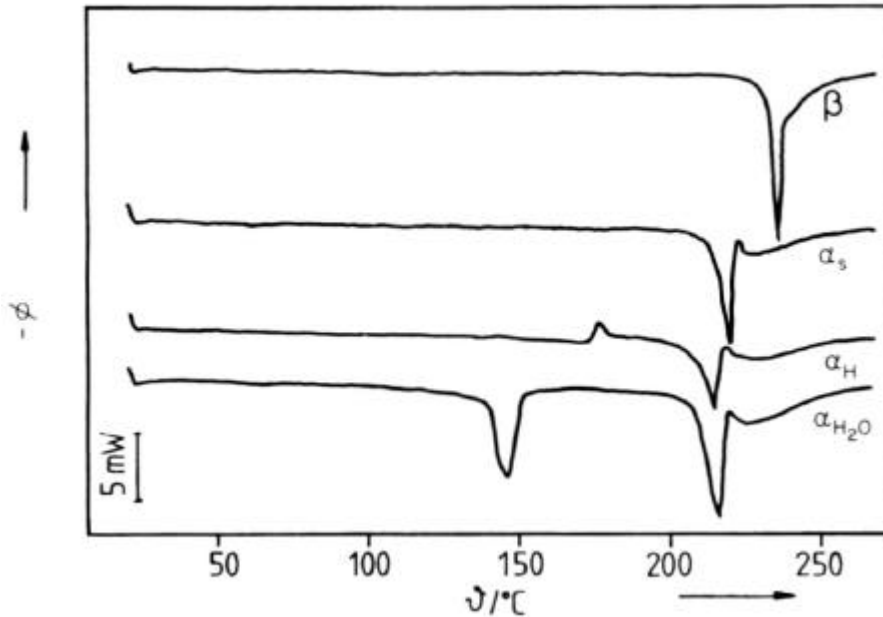


Figura 4. Curvas de DSC de diferentes tipos de lactosa.

La Fig. 5 muestra la curva de DSC para α -lactosa monohidrato en las condiciones indicadas en materiales y métodos. En dicha curva se observa que la endoterma de deshidratación comienza aproximadamente a 141,40 °C presenta un pico a 147,67 °C y vuelve a la línea base a 153,73 °C. La endoterma de fusión comienza a 216,43 °C tiene un máximo de fusión a 221,50 °C y recobra la línea base a 224,29 °C. A temperaturas mas altas la muestra sufre descomposición y carbonización. Estos datos concuerdan con los anteriormente mencionados para la α -lactosa monohidrato.

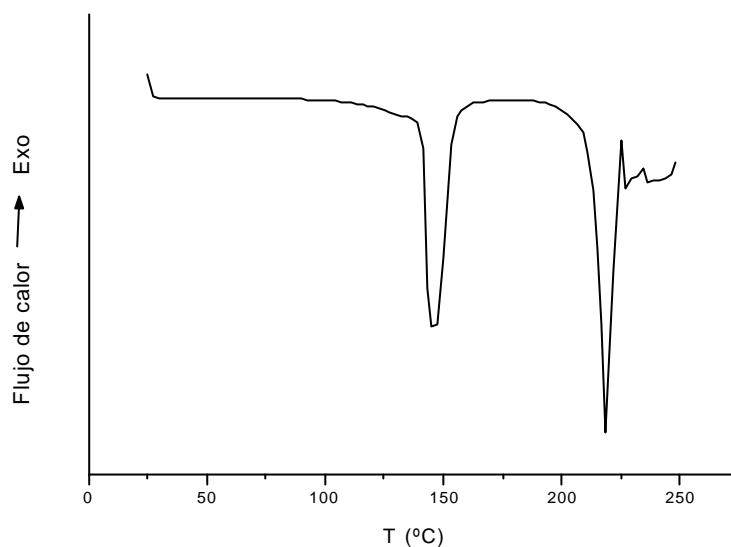


Figura 5. Curva de DSC de la lactosa monohidrato.

El otro excipiente empleado como modulador de la cesión en estos cementos modificados fue la hidroxipropilmetilcelulosa. Este polímero derivado de la celulosa es un excipiente farmacéutico que se suele utilizar como aglutinante en formulaciones de comprimidos, como agente suspensor en formulaciones tópicas, por ejemplo en gotas oftálmicas, como componente de cubiertas poliméricas y en comprimidos matriciales de cesión sostenida (Handbook of pharmaceutical excipients, 2000). La inclusión de un polímero hidrosoluble como la HPMC en la matriz formada por cemento óseo tiene por objeto modificar la velocidad de cesión de la gentamicina al crear canales acuosos por donde el principio activo puede difundir. En la bibliografía se muestran discrepancias importantes en cuanto a los valores de T_g de este derivado de celulosa que se atribuyen a la técnica analítica empleada, DSC o MTDSC (Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry), al tamaño de las muestras analizadas, a los parámetros seleccionados para el desarrollo del método como la velocidad de calentamiento de las muestras, etc. De forma que, por ejemplo Entwistle y Rowe, establecen que su valor es 177 °C, mientras que McPhillips indica que es de 162 °C, y Sakellariou reflejan valores de 157 °C para las muestras en forma de finas películas y de 180 °C para las muestras de este excipiente en forma de polvo (Entwistle y Rowe, 1979), (McPhillips y col., 1999), (Sakellariou y col., 1986).

La Fig. 6 muestra la curva de DSC de un primer calentamiento de la HPMC en la que se aprecia un ancho pico endotérmico que comienza a 26,29 °C que alcanza su máximo a 70,17 °C y finaliza a 100,97 °C y que se corresponde con la pérdida de agua de la muestra. A partir de 266,30 °C comienza a aparecer un pico exotérmico que se corresponde con la descomposición de la HPMC.

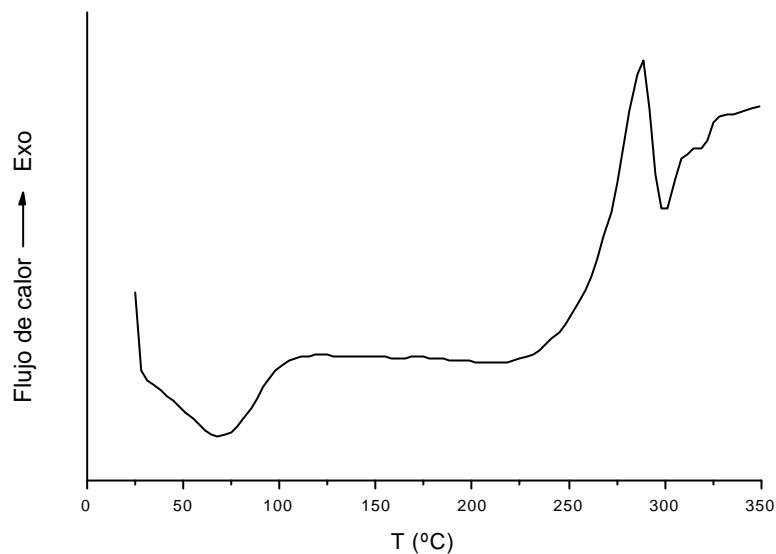


Figura 6. Curva de DSC del primer calentamiento de la HPMC.

La Fig. 7 muestra la curva de DSC de un segundo calentamiento de la HPMC, en la que se obtiene un valor de 162,24 °C para la temperatura de transición vítrea, T_g . El principio de la transición ocurre a 161,07 °C. Este resultado concuerda con los descritos en la literatura anteriormente (McPhillips y col., 1999).

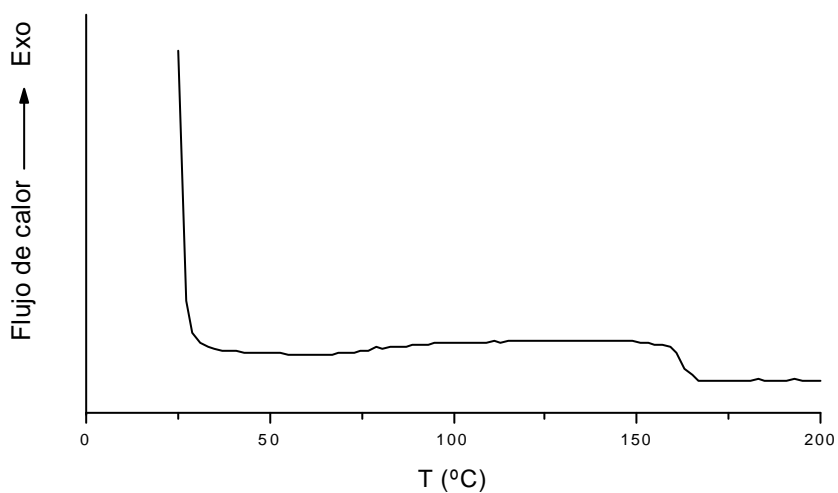


Figura 7. Curva de DSC del segundo calentamiento de la hidroxipropilmetilcelulosa.

PMMA es un material polimérico transparente y es el principal componente de los cementos óseos acrílicos, la temperatura de transición vítrea del PMMA es de aproximadamente 100 °C (Kuo y col., 2003).

En la Fig 8 se muestran las curvas de DSC correspondientes al cemento óseo comercial CMW1[®] Radiopaco y al cemento óseo comercial incluyendo sulfato de gentamicina. En ambos casos se utilizó el componente en polvo. Para el cemento comercial sin gentamicina la curva de DSC presenta una transición que comienza a 109,92 °C y la T_g se alcanza a 115,58 °C, la endoterma de descomposición comienza a 226,03 °C alcanzando el pico máximo a 262,60 °C, datos que concuerdan con los observados en la bibliografía (Kuo y col., 2003), (Colom y col., 2001). Para el cemento comercial con gentamicina la transición comienza a 92,92 °C y la T_g se alcanza a 112,75 °C, la endoterma de descomposición comienza a 214,70 °C alcanzando el pico máximo a 262,60 °C. Como se puede observar, la inclusión de gentamicina en la muestra no modifica drásticamente el comportamiento térmico del cemento óseo y solamente se observa un ligero desplazamiento de la T_g hacia valores menores. El pico endotérmico de fusión correspondiente a la gentamicina que debería aparecer a 244 °C no se aprecia en la curva de DSC debido a que se encuentra enmascarado por el pico endotérmico de descomposición del cemento (262,60 °C).

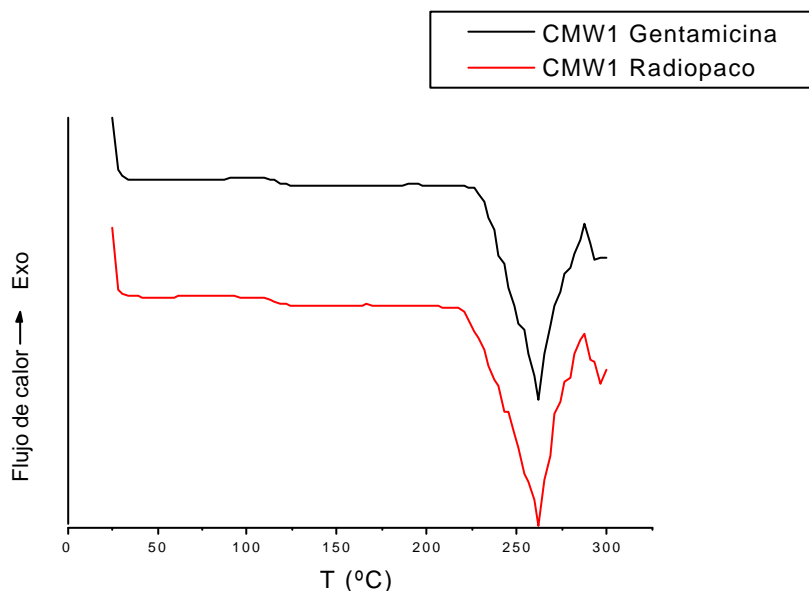


Figura 8. Curvas de DSC del 2º calentamiento del componente en polvo de los cementos CMW1[®] Radiopaco y CMW1[®] Gentamicina.

En la Fig 9 se recogen las curvas de DSC del segundo calentamiento de los cementos comerciales una vez polimerizados. El cemento comercial polimerizado que contiene gentamicina inicia su cambio de temperatura de transición vítrea a 97,78 °C y el punto medio aparece a 113,10 °C, mientras que el cemento comercial polimerizado sin gentamicina el punto medio se observa a 109,27 °C. Estas pequeñas diferencias en la temperatura de transición vítrea no se consideran significativas debido al pequeño cambio energético que han sufrido las muestras. En esta gráfica si que se observa el pico de fusión correspondiente a la gentamicina (251,06 °C). En ambas gráficas los picos endotérmicos de descomposición del cemento aparecen a 372,64 °C. El desplazamiento hacia temperaturas superiores del pico de descomposición del cemento polimerizado 372,64 °C en comparación con el pico de descomposición del cemento en polvo 262,60 °C se atribuye a la presencia del peróxido de benzoilo en la muestra del cemento en polvo que acelera la descomposición del PMMA.

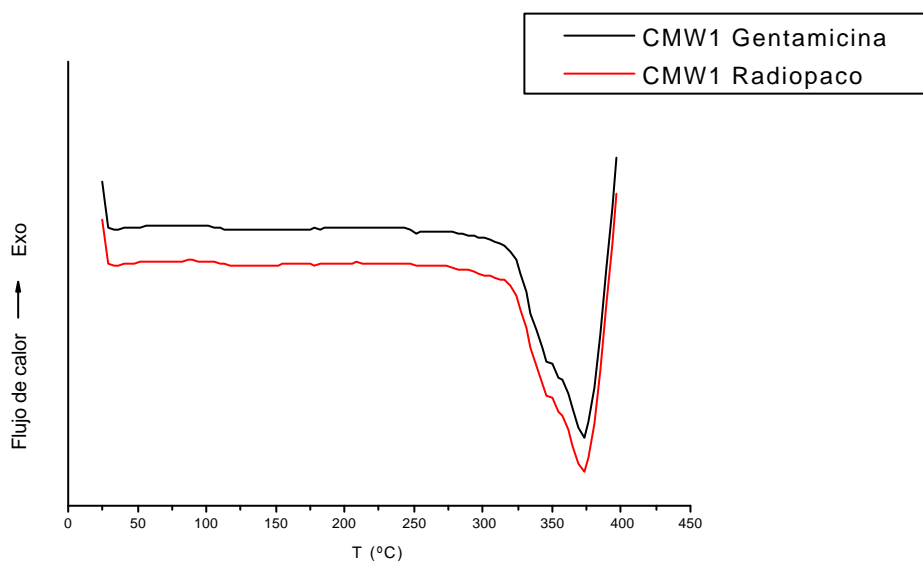


Figura 9. Curvas de DSC del 2º calentamiento de los cementos polimerizados CMW1^Ø Radiopaco y CMW1^Ø Gentamicina.

En la Fig. 10 se recogen las curvas de DSC del cemento comercial polimerizado que incluye gentamicina en su composición antes y después de realizar el ensayo de cesión. Ambas muestras presentan valores de T_g similares 113,10 °C y 116,93 °C para las muestras antes y después de ser sometidas al ensayo de cesión respectivamente, similares además al valor de T_g recogido en la bibliografía para el PMMA. Los picos de descomposición de ambas muestras aparecen a 372,64 °C de forma que el ensayo de cesión no ha influido en la estabilidad de estos cementos óseos. Es de destacar que la muestra que no ha sido sometida al ensayo de cesión recoge el pico de fusión de la gentamicina mientras que este pico no aparece en la curva de la muestra que ha sido

sometida al ensayo de cesión de lo que se deduce que la pequeña liberación de gentamicina ha sido suficiente para que su detección quede por debajo del límite de sensibilidad del método.

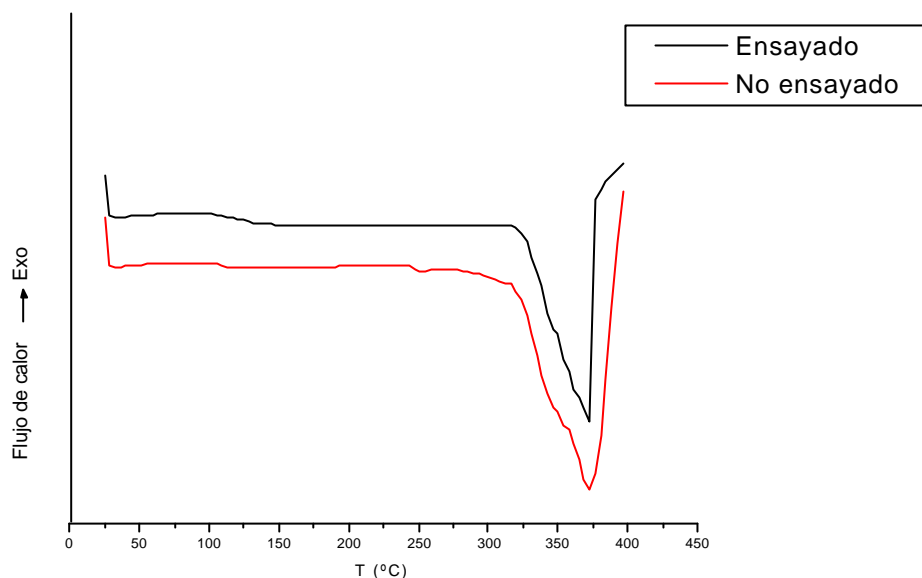


Figura 10. Curvas de DSC del 2º calentamiento del cemento CMW1⁰ Gentamicina, antes y después del ensayo de cesión.

A continuación a modo de ejemplo se muestra la curva de DSC de 1º calentamiento de uno de los cementos modificados que contienen lactosa en su composición, concretamente una formulación que contiene un 20% de lactosa y un 4% de gentamicina. En esta Fig. 11 se aprecia claramente un primer pico endotérmico a 149,17 °C que se corresponde con la pérdida de una molécula de agua de la deshidratación de la α - lactosa monohidrato. La confirmación de que esta lactosa que contienen las muestras es la α - lactosa monohidrato se comprueba por el siguiente pico endotérmico que aparece a 212,83 °C y por la inexistencia de picos exotérmicos a 170 °C (Chidavaenzi y col., 1997), (Figura, 1993), (Giron y col., 1989), (Berlin y col., 1971).

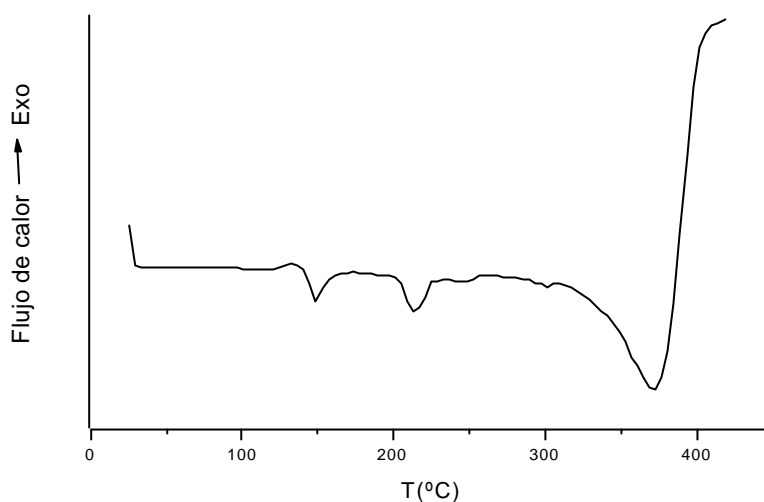


Figura 11. Curva de DSC del 1º calentamiento del cemento modificado polimerizado 20LAG.

La Fig. 12 representa las curvas de DSC (2º calentamiento) de las muestras de los cementos modificados que contienen lactosa. En esta figura se observa que el pico de fusión y descomposición correspondiente a la lactosa es mayor a medida que se incrementan los porcentajes de lactosa en las formulaciones. Este mismo hecho también ocurre con los picos de fusión de la gentamicina (que aparecen alrededor de 250 °C). Permanece la T_g del PMMA en todas las formulaciones con valores similares a los referidos en la bibliografía (109,34 °C-117 °C) (Kuo y col., 2003), (Colom y col., 2001). Finalmente los picos de descomposición que aparecen entre 361-369 °C concuerdan con los picos de descomposición del cemento comercial. De todo lo cual se deduce que no ha habido interacción entre la lactosa y el resto de los componentes del cemento óseo.

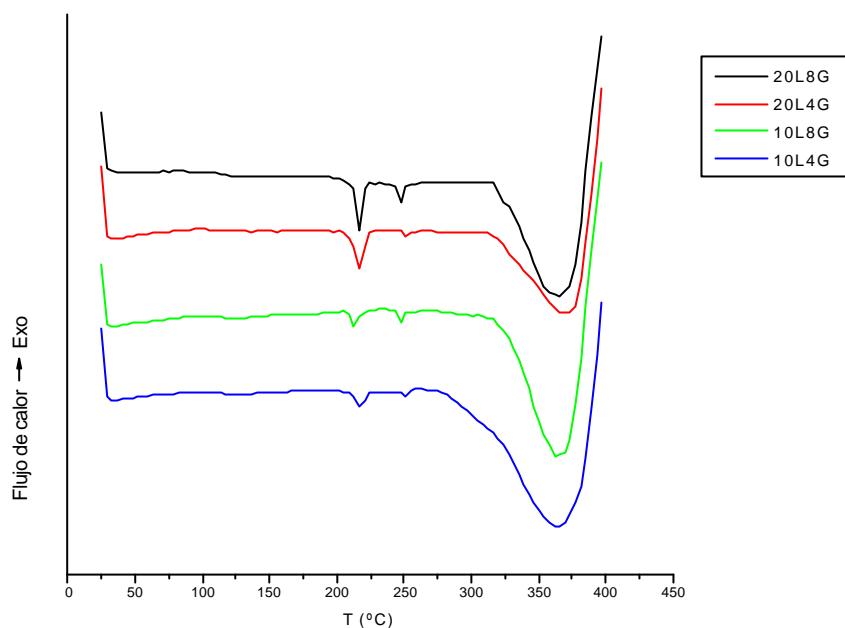


Figura 12. Curvas de DSC del 2º calentamiento de los cementos modificados con lactosa y gentamicina.

En la Fig 13 se pueden ver las curvas de DSC del segundo calentamiento de las formulaciones que contienen lactosa después de haber realizado los estudios de cesión. La T_g del polímero (112,03 °C-116,28 °C) se mantiene igual a la del cemento comercial. El pico de descomposición del PMMA continua apareciendo a 370 °C lo que junto a su valor de T_g indica que no se ha producido alteraciones de estos cementos comerciales que contienen lactosa con el estudio de cesión. El pico de fusión y descomposición de la lactosa presenta mayor área cuanto mayor porcentaje de lactosa se incluye en la formulación pero la intensidad del pico es menor que en los cementos a los que no se le ha realizado el estudio de cesión lo que confirma que parte de la lactosa se ha disuelto en el ensayo aunque todavía queda un remanente de lactosa en las formulaciones que es mayor en las formulaciones que contienen un 20% de este excipiente. Estos picos de la lactosa aparecen entre 209-214 °C y se corresponden con la α - lactosa monohidrato. En estas curvas no se aprecian los picos de fusión de la gentamicina al igual que ocurría en el cemento comercial tras el estudio de disolución.

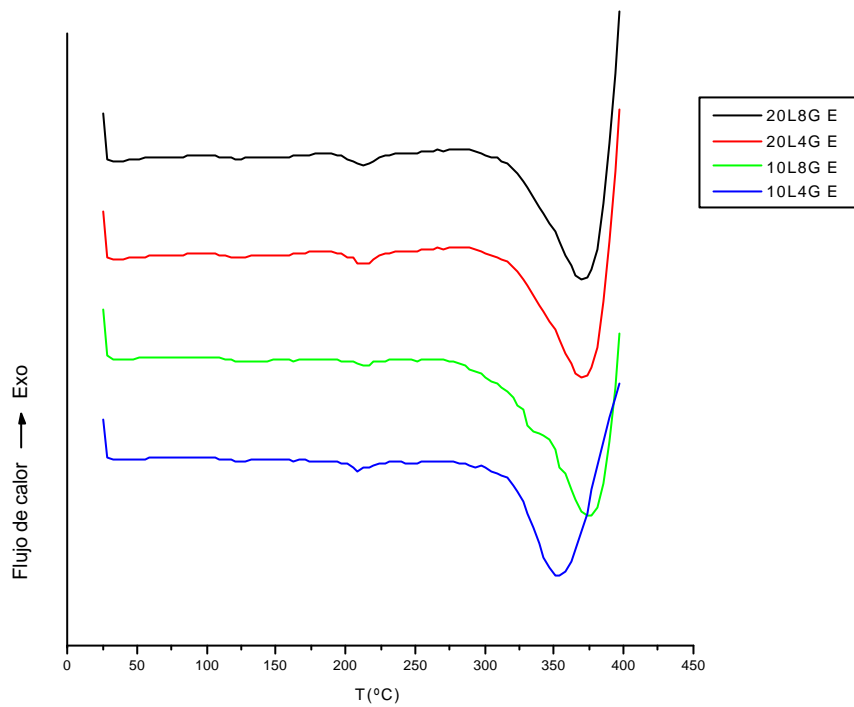


Figura 13. Curvas de DSC del 2º calentamiento de los cementos modificados con lactosa y gentamicina después del ensayo de cesión.

En la siguiente Fig. 14 se muestran las curvas de DSC de los cementos modificados con la HPMC antes del ensayo de cesión (2º calentamiento). En estas curvas a partir de 260 °C se empiezan apreciar cambios endotérmicos debidos a la descomposición tanto de la HPMC como del PMMA. Los picos correspondientes a la fusión de la gentamicina son nuevamente más intensos cuanto mayor es el porcentaje de antibiótico en el cemento. La presencia de las dos temperaturas de transición vítreas del PMMA y del HPMC indican que no se ha producido una interacción entre ambos polímeros.

Estos cambios de transición vítreos son más acusados en las muestras de los cementos tras haber sido sometidos a los ensayos de cesión (Fig. 15) por lo que tampoco tras el ensayo de cesión se ha producido ninguna alteración evidente. Como en las otras muestras de los cementos ensayados no aparecen los picos de fusión correspondientes a la gentamicina.

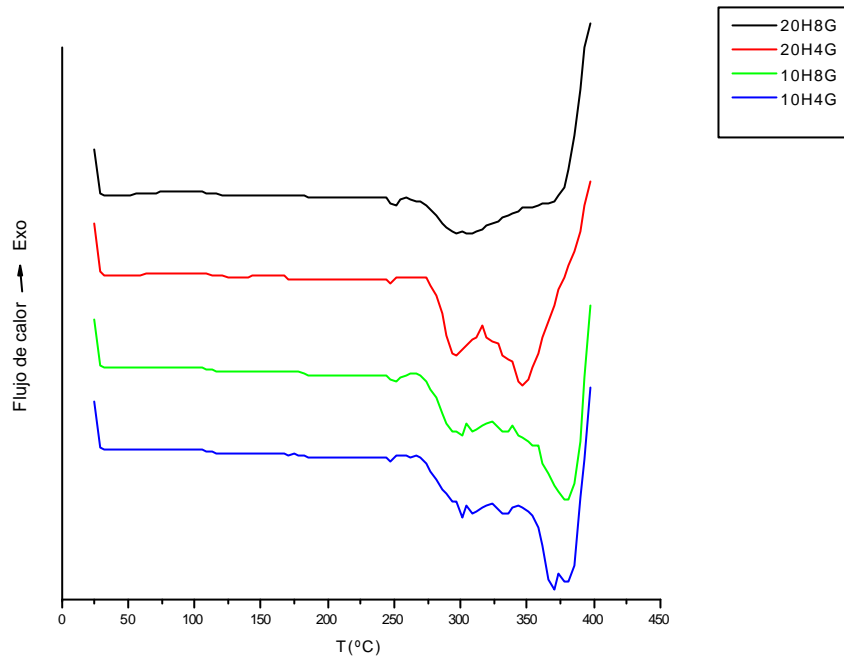


Figura 14. Curvas de DSC del 2º calentamiento de los cementos modificados con HPMC y gentamicina.

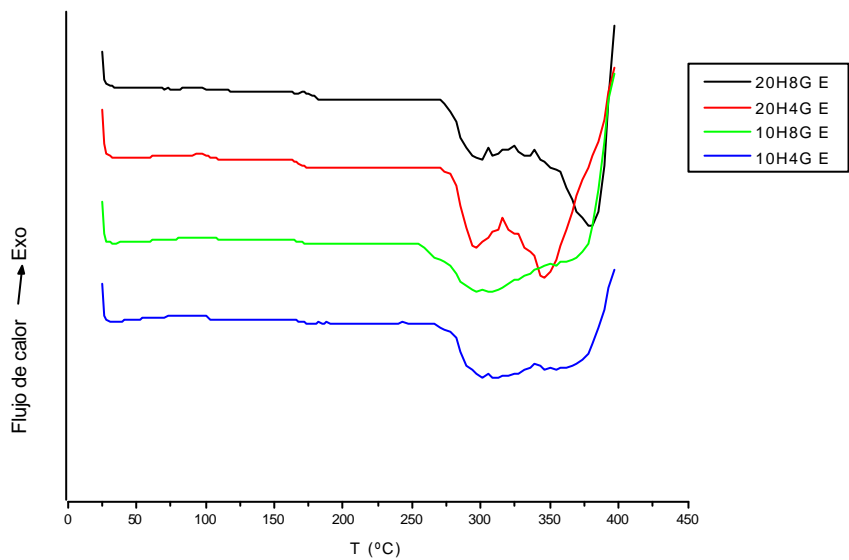


Figura 15. Curvas de DSC del 2º calentamiento de los cementos modificados con HPMC y gentamicina después del ensayo de cesión.

Por lo tanto se puede concluir que no se aprecian problemas de incompatibilidad entre los componentes del cemento óseo y los excipientes moduladores de la cesión en las proporciones ensayadas (lactosa e HPMC).

3.3.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

En la Fig. 16 se muestra el espectro de la gentamicina. Como se observa en esta figura la gentamicina se presenta en estado amorfo con un halo centrado aproximadamente en $2\theta = 20^\circ$. Estudiando esta muestra por microscopía electrónica de barrido se ve que la partículas de gentamicina presentan una forma esférica con una o varias hendiduras (Fig. 17) que indican que se obtuvieron por un proceso de atomización. Este resultado está de acuerdo con la interpretación de difracción de rayos X ya que la atomización produce partículas en estado amorfo (Torrado y col., 2001).

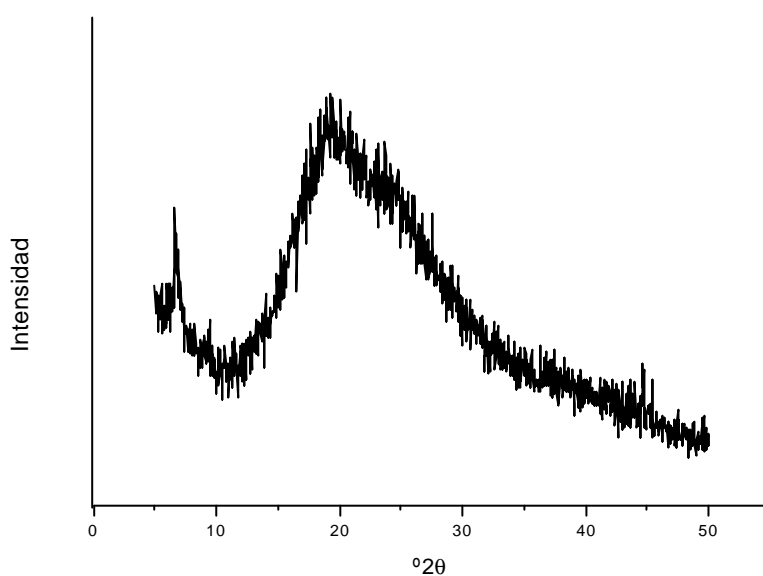


Figura 16. Espectro del sulfato de gentamicina.

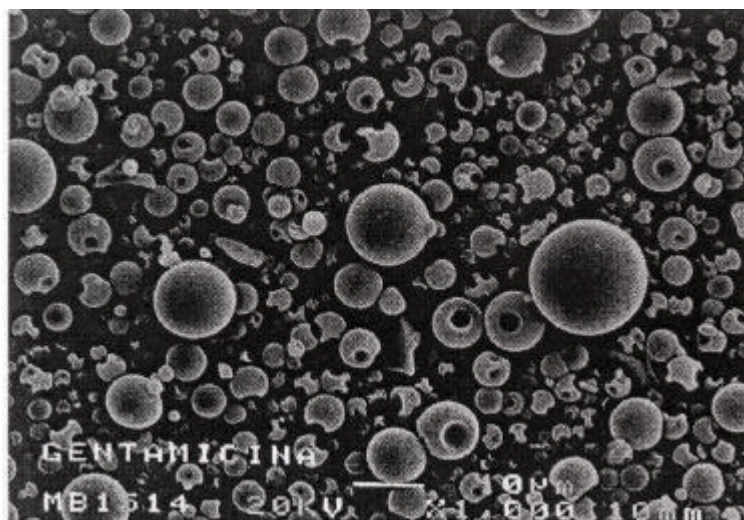


Figura 17. Fotografía del sulfato de gentamicina ($\times 1000$).

En la Fig. 18 se muestra el perfil de cristalinidad de la lactosa utilizada en estos ensayos. De acuerdo con la bibliografía se han caracterizado, por difracción de rayos X, tres estructuras cristalinas de la α -lactosa (α -lactosa monohidrato, α -lactosa anhidra higroscópica y α -lactosa anhidra estable) (Fries y col., 1971) (Beevers y Hansen, 1971) y una estructura cristalina de la β -lactosa (Platteau y col., 2004). Así mismo, se han identificado compuestos mixtos α - β -lactosa con diferentes estequiometrías (Drapier-Beche y col., 1998).

En la Fig. 18 se aprecian picos específicos a $12,5^\circ$; $16,5^\circ$; 17° ; 19° ; $19,5^\circ$; $19,8^\circ$; $20,7^\circ$ y $21,1^\circ$, que concuerdan con los picos de difracción que se recogen en la bibliografía para la α -lactosa monohidrato (Garnier y col., 2002) y en la base de datos del CAI de difracción de rayos X de la UCM. La ausencia de pico característico a $10,5^\circ$ de la forma β -lactosa refleja la ausencia de este polimorfo de lactosa.

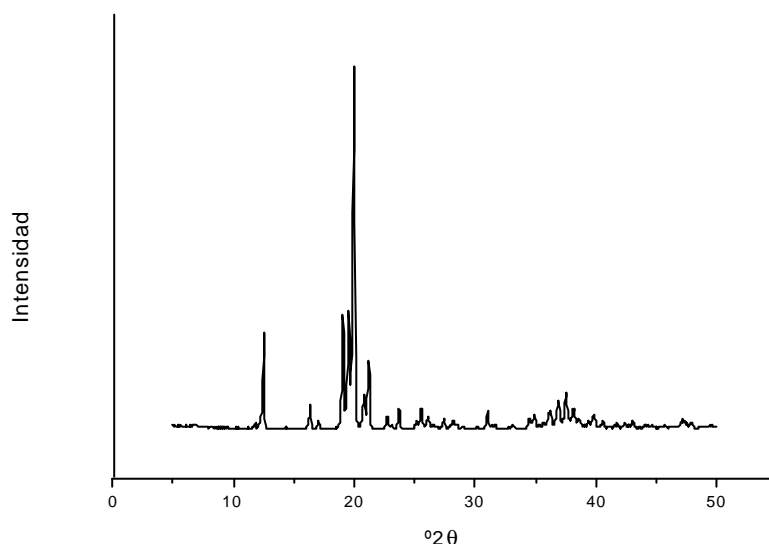


Figura 18. Espectro de la α lactosa monohidrato.

En la Fig. 19 se muestra el espectro de la HPMC. Como se observa en esta figura la hidroxipropilmetilcelulosa se presenta en estado amorfo con un halo centrado aproximadamente en $2q = 19^\circ$.

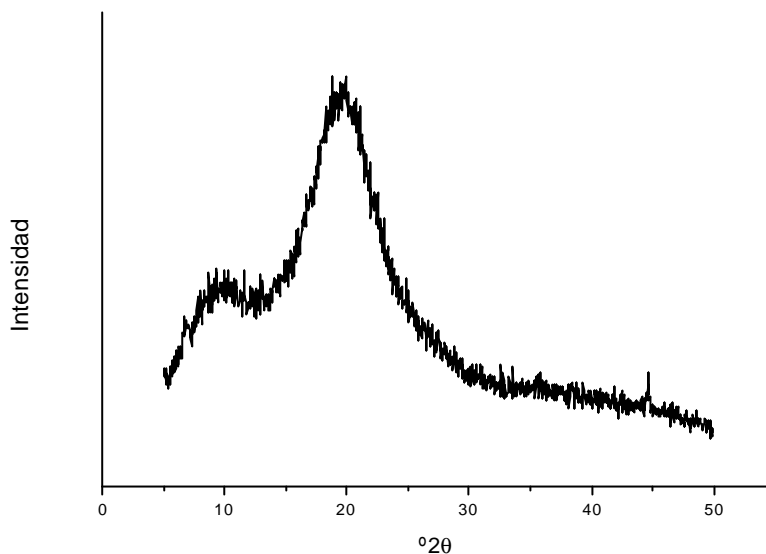


Figura 19. Espectro de la HPMC.

El espectro correspondiente al cemento CMW1[®] Radiopaco en polvo (Fig. 20) muestra un halo amorfo centrado en $2\theta = 14^\circ$ y varios picos agudos característicos de estructuras cristalinas en $2\theta = 20,4^\circ; 22,7^\circ; 24,8^\circ; 25,8^\circ; 26,8^\circ; 28,7^\circ; 31,5^\circ; 32,7^\circ; 40,7^\circ; 42,5^\circ; 42,9^\circ; 43,9^\circ; 49,0^\circ$. El halo amorfo puede ser atribuido al polímero PMMA mientras que los picos previamente descritos corresponden al sulfato de bario (Torrado y col., 2001) (CAI, difracción de rayos X, UCM).

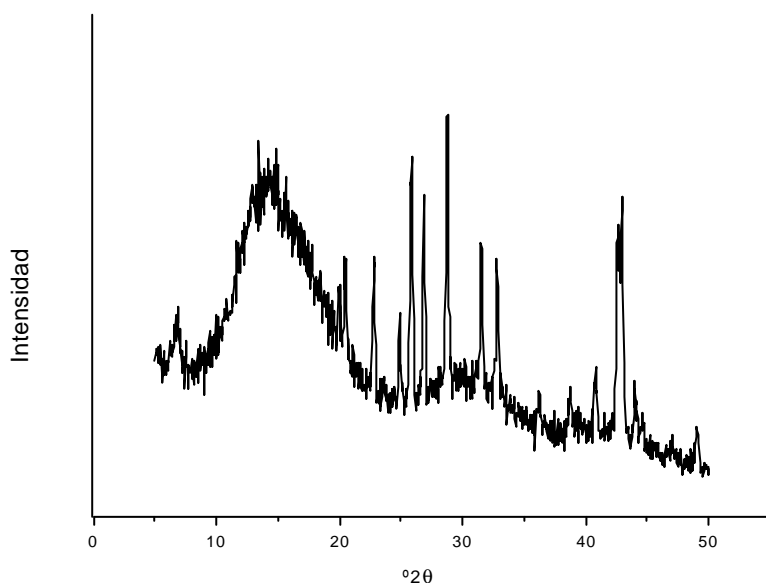


Figura 20. Espectro del componente en polvo del cemento comercial CMW1[®] Radiopaco.

Si comparamos el espectro del componente en polvo del cemento CMW1[®] Radiopaco y de este cemento polimerizado (Fig. 21) se puede ver como el halo amorfo es de menor intensidad en el cemento polimerizado, y por otra parte los picos de difracción de los compuestos cristalinos del cemento polimerizado presentan una mayor intensidad que sus correspondientes picos en el cemento en polvo. Las diferencias observadas se atribuyen a que las muestras de cemento polimerizado son piezas irregulares que no presentan los mismos defectos geométricos de observación que las muestras de cemento en polvo, de tal manera que la comparación de ambas muestras se considera cualitativa. Debido a que el halo amorfo y los picos de difracción cristalinos observados en ambas muestras se presentan a los mismos ángulos de difracción, se puede concluir que durante la polimerización no se ha producido una interacción entre el sulfato de bario cristalino y el PMMA amorfo ni del sulfato de bario con el resto de los componentes de la formulación. Por otra parte, también es posible que el PMMA prepolimerizado absorba una mayor cantidad de rayos X que el mismo polímero tras el proceso del curado del cemento. Esta hipótesis explicaría la mayor intensidad del halo amorfo correspondiente al PMMA y la menor intensidad de los picos del sulfato de bario en la muestra del cemento en polvo.

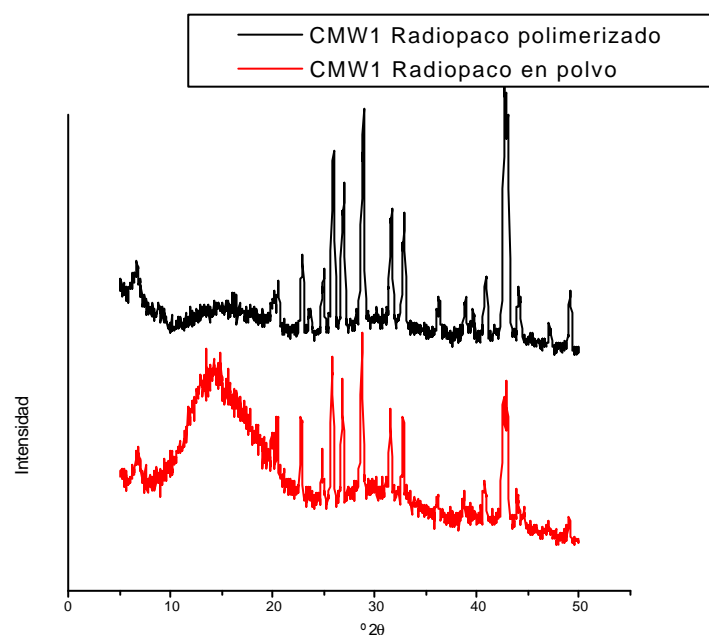


Figura 21. Espectros del componente en polvo del cemento comercial CMW1[®] Radiopaco y del cemento polimerizado.

La incorporación de gentamicina al cemento no modifica prácticamente el espectro (Fig. 22). Los halos amorfos están centrados en $2\theta = 14^\circ$ y los picos debidos al sulfato de bario no se modifican.

El halo amorfo de la gentamicina está enmascarado por el halo amorfo del PMMA. Ninguna de las proporciones añadidas de gentamicina (4, 6, 8%) ha producido interacción alguna con el resto de los componentes del cemento sin polimerizar.

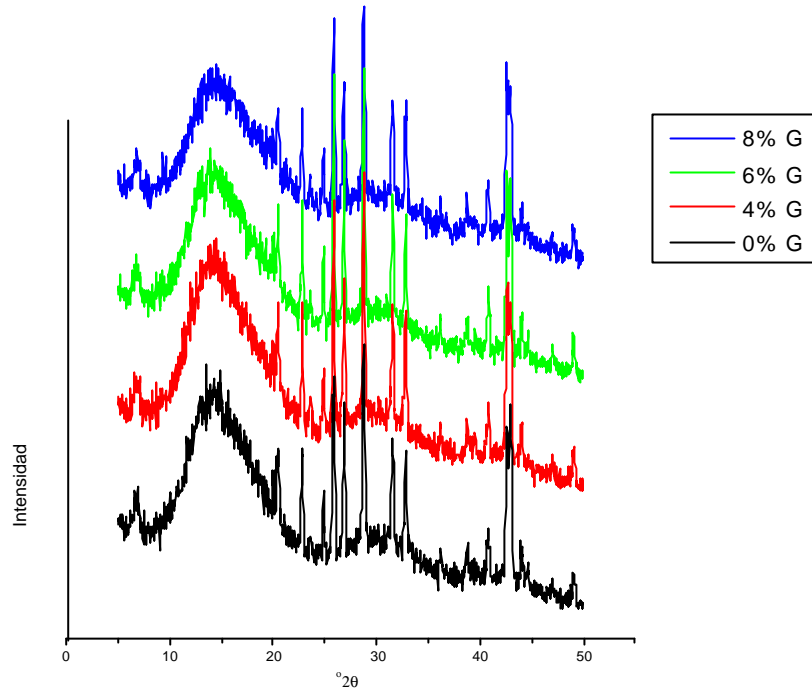


Figura 22. Espectros de las mezclas físicas del componente en polvo del cemento comercial CMW1[®] Radiopaco y distintos porcentajes de sulfato de gentamicina.

La incorporación de α - lactosa monohidrato en la mezcla física hace que aparezca un pico $2\theta = 12,4^\circ$ claramente separado del resto de picos de difracción, así como un pico de gran intensidad a $19,8^\circ$ ambos característicos de este excipiente (Fig. 23). El pico correspondiente a $12,4^\circ$ es más intenso en las muestras a medida que éstas tienen una mayor proporción de lactosa. Sin embargo a igual proporción de lactosa este pico es menor cuanto mayor es el porcentaje de gentamicina contenido en la muestra (ver muestras 20% L, 4% G y 20% L, 8% G). Lo mismo ocurre con el pico correspondiente a la lactosa de $19,8^\circ$ y en los distintos picos de difracción correspondientes al sulfato de bario. Este hecho se puede atribuir a una posible absorción de los rayos X por parte de la gentamicina, sobre todo cuando esta se encuentra en una proporción elevada 8%.

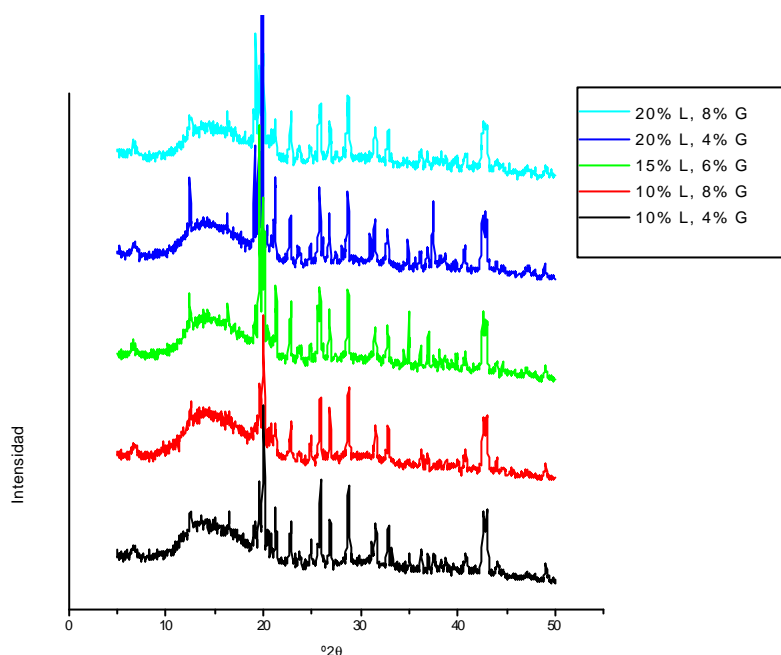


Figura 23. Espectros de las mezclas físicas del componente en polvo del cemento comercial CMW10 Radiopaco y distintos porcentajes de sulfato de gentamicina y lactosa monohidrato.

En la Fig. 24 se presentan los espectros de las mezclas físicas del cemento con la HPMC y la gentamicina. Estos espectros no se modifican con la adición ni de gentamicina ni de la HPMC, ya que ambos compuestos son amorfos y sus halos centrados a 20° se superponen con el halo amorfo del PMMA (14°). El resto de picos de difracción observados en la muestra son debidos al sulfato de bario.

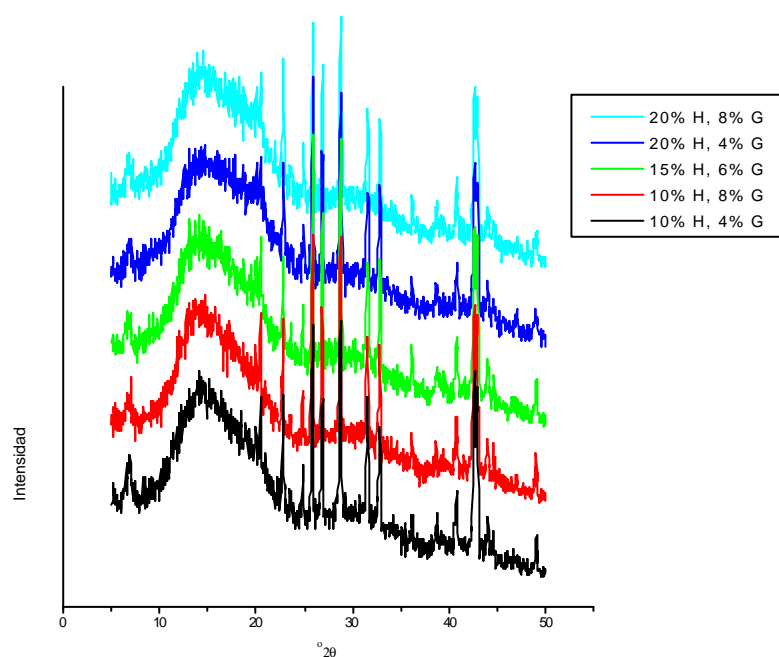


Figura 24. Espectros de las mezclas físicas del componente en polvo del cemento comercial CMW10 Radiopaco y distintos porcentajes de sulfato de gentamicina e HPMC.

El estudio de difracción de rayos X de las mezclas físicas del componente en polvo de los cementos modificados indica que la estructura cristalina tanto de la lactosa como del sulfato de bario se mantiene inalterada.

En la Fig. 25 se presentan los espectros del cemento polimerizado CMW1[®] Gentamicina antes y después de los ensayos de cesión. Ambos espectros de difracción son prácticamente iguales, lo cual está de acuerdo con los ensayos de velocidad de cesión, según los cuales el porcentaje de gentamicina cedido no alcanza el 3% y el resto de los componentes no son hidrosolubles o están atrapados en la matriz polimérica y no se liberan.

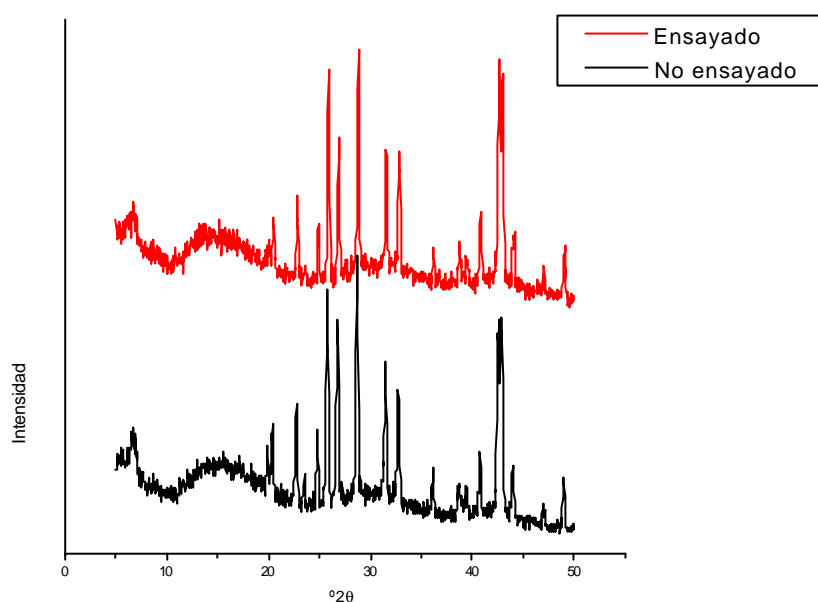


Figura 25. Espectros del cemento comercial CMW1[®] Gentamicina antes y después de los ensayos de cesión.

En la Fig. 26 se presentan los espectros de los cementos modificados con distintas proporciones de lactosa y gentamicina. La ausencia del pico a 12,4° correspondiente a la lactosa en las muestras que contienen un 20% de este excipiente no se atribuye a que esta lactosa se encuentre en forma amorfa ya que como se ha visto en los estudios de calorimetría diferencial de barrido contienen lactosa en su forma α - lactosa monohidrato. Estas muestras con un 20% de lactosa presentan también una menor intensidad del pico de la lactosa correspondiente a 19,8° y de todos los picos de difracción del sulfato de bario, lo que se atribuye a la gran irregularidad de la superficie de estas muestras, como se observó en el estudio de microscopia electrónica de barrido.

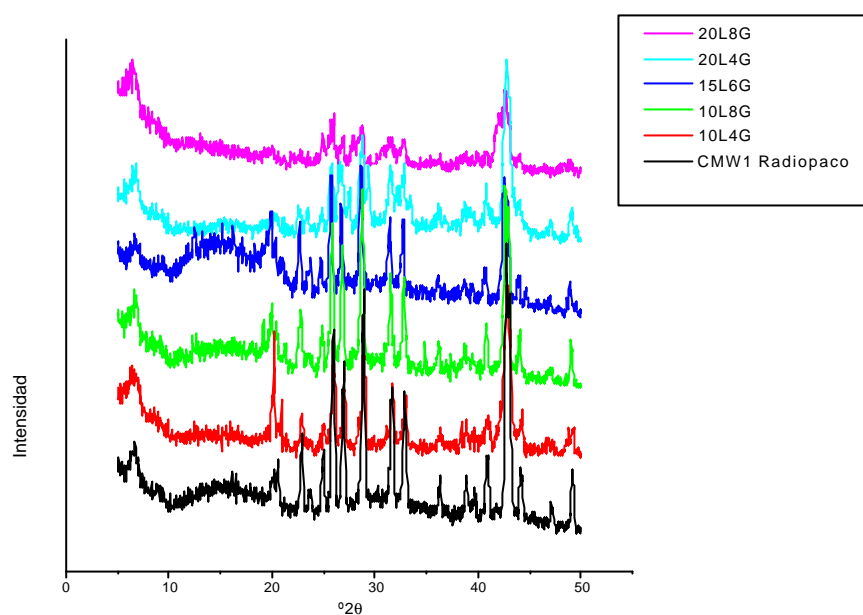


Figura 26. Espectros de los cementos modificados con lactosa y sulfato de gentamicina.

En la Fig. 27 se presentan los espectros de los cementos modificados con lactosa y gentamicina después de haberse realizado los ensayos de cesión. En este caso, el pico de la lactosa de 12,4° queda enmascarado por el halo amorfo del PMMA. Por otra parte, se aprecia claramente el pico de difracción correspondiente a la lactosa a 19,8° en las dos muestras que contienen un 20% de lactosa. Este pico no se observa en las muestras que contienen un 15% y un 10% de lactosa. Sin embargo, en los estudios de calorimetría diferencial de barrido si se observa que los cementos con un 10% de lactosa presentan el pico de fusión correspondiente a este excipiente tras el ensayo de cesión (ver Fig. 13). Por lo que las diferencias en los difractogramas de estos cementos ensayados se atribuyen nuevamente a la dificultad del análisis mediante PXRD de muestras de forma irregular.

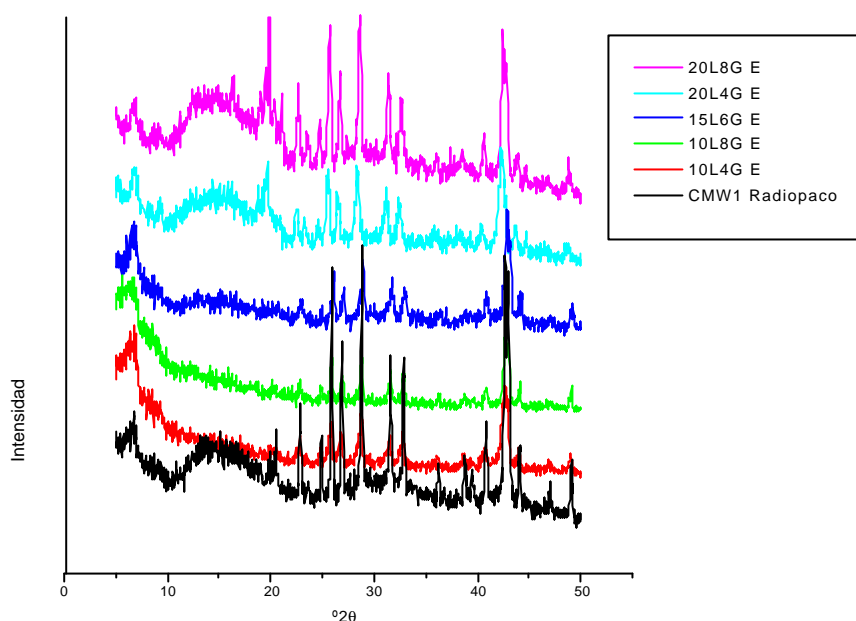


Figura 27. Espectros de los cementos modificados con lactosa y sulfato de gentamicina después del ensayo de cesión.

En la Fig. 28 se presentan los espectros de los cementos modificados con HPMC y gentamicina. El halo amorfo correspondiente al solapamiento de los halos amorfos del PMMA, la HPMC y la gentamicina es menos intenso en estas muestras polimerizadas que en las mismas muestras sin polimerizar, ver Fig. 24, lo que sugiere nuevamente que el PMMA prepolimerizado absorbe una mayor proporción de rayos X que el sometido al proceso de fraguado (ver Fig. 21). La mayor intensidad del halo amorfo de las muestras que contienen un 20% de HPMC es debido a su mayor contenido de este excipiente amorfo.

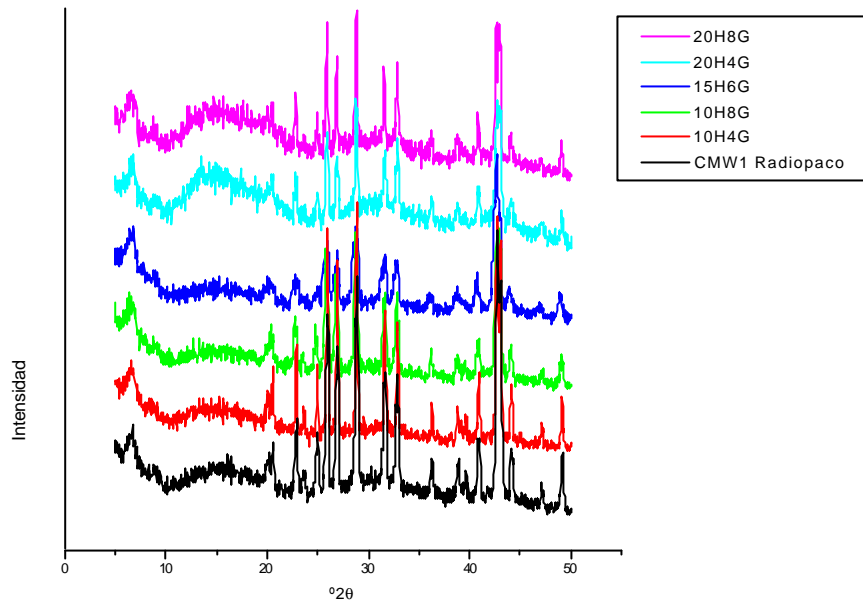


Figura 28. Espectros de los cementos modificados con HPMC y sulfato de gentamicina.

En la Fig. 29 se presentan los espectros de los cementos modificados con HPMC y gentamicina después de los ensayos de cesión. La muestra que contiene un 15% de HPMC presenta un mayor halo amorfo que las muestras que contienen un 10% y un 20% de HPMC, sin embargo esta diferencia de intensidad del halo amorfo no se puede atribuir a que exista una mayor proporción de este excipiente amorfo tras el ensayo de cesión ya que esta misma muestra también presenta una mayor intensidad en los picos de difracción correspondientes al sulfato de bario. Por lo que las diferencias observadas se atribuyen a diferencias en la orientación de la superficie de las muestras durante su análisis.

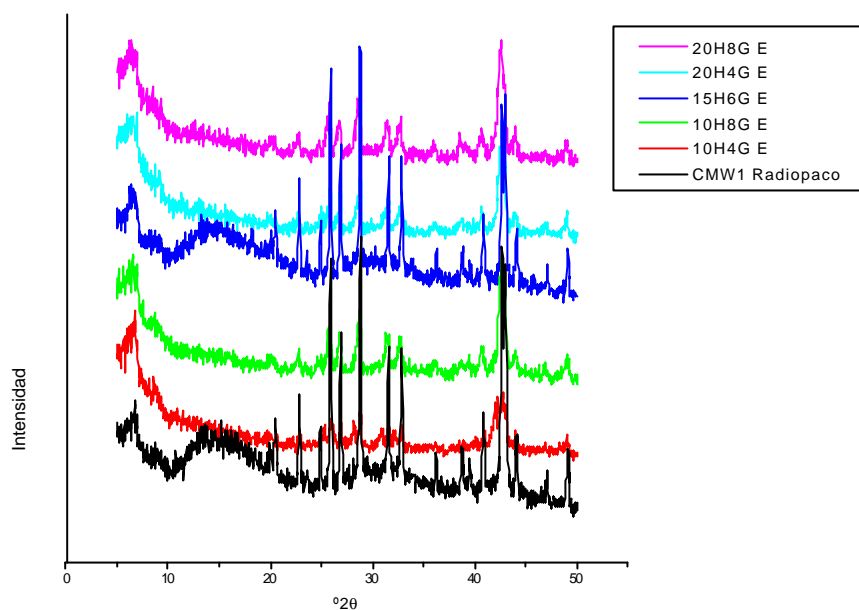


Figura 29. Espectros de los cementos modificados con HPMC y sulfato de gentamicina después del ensayo de cesión.

3.4. BIBLIOGRAFÍA

1. Angberg M. Lactose and thermal analysis with special emphasis on microcalorimetry. *Thermochim Acta* 1995;248:161-176.
2. Beevers CA, Hansen HN. The structure of α -lactose monohydrate. *Acta Cryst* 1971;B27:1323-1325.
3. Berlin E, Anderson AB, Pallansch MJ. Effect of temperature on water vapor sorption by dried milk powders. *J Dairy Sci* 1970;53:146-149.
4. Berlin E, Kliman PG, Anderson BA, Pallansch MJ. Calorimetric measurement of the heat of desorption of water vapour from amorphous and crystalline lactose. *Thermochim Acta* 1971;2:143-152.
5. Colom X, García T, Suñol JJ, Saurina J, Carrasco F. Properties of PMMA artificially aged. *J Non-Cryst Solids* 2001;287:308-312.
6. Chidavaenzi OC, Buckton G, Koosha F, Pathak R. The use of thermal techniques to assess the impact of feed concentration on the amorphous content and polymorphic forms present in spray dried lactose. *Int J Pharm* 1997;159:67-74.
7. Diakoumakos CD, Raptis I. In situ monitoring of thermal transitions in thin polymeric films via optical interferometry. *Polymer* 2003;44:251-260.

8. Drapier-Beche N, Fanni J, Parmentier M. Kinetics of the synthesis of lactose molecular compounds. *J Dairy Sci* 1998;81:2826-2832.
9. Entwistle CA, Rowe RC. Plasticization of cellulose ethers used in the film coating of tablets. *J Pharm Pharmacol* 1979;31:269-272.
10. Figura LO. The physical modification of lactose and its thermoanalytical identification. *Thermochim Acta* 1993;222:187-194.
11. Fries DC, Rao ST, Sundaralingam M. Structural chemistry of carbohydrates. III. Crystal and molecular structure of 4-*O*- β -D-galactopyranosyl- α -D-glucofuranose monohydrate (α -lactose monohydrate). *Acta Cryst* 1971;B27:994-1005.
12. Garnier S, Petit S, Coquerel G. Dehydration mechanism and crystallisation behaviour of lactose. *J Therm Anal Cal* 2002;68:489-502.
13. Giron D, Goldbronn CH, Piechon P. Thermal analysis methods for pharmacopoeial materials. *J Pharm Bio Anal* 1989;7(12):1421-1433.
14. Handbook of pharmaceutical excipients, 3rd ed. In: Kibbe AH, editor. American Pharmaceutical Association, 2000. p. 252-255.
15. Kuo SW, Kao HC, Chang FC. Thermal behavior and specific interaction in high glass transition temperature PMMA copolymer. *Polymer* 2003;44:6873-6882.
16. Lerk CF, Andreae AC, de Boer AH, Bolhuis GK, Zuurman K, de Hoog P, Kussendrager K, van Leverink J. Increased binding capacity and flowability of alpha-lactose monohydrate after dehydration. *J Pharm Pharmacol* 1983;35(11):747-748.
17. McPhillips H, Craig DQM, Royall PG, Hill VL. Characterisation of the glass transition of HPMC using modulated temperature differential scanning calorimetry. *Int J Pharm* 1999;180:83-90.
18. Merck, and Co. Merck index, 12th ed. New York: Chapman & Hall, 1996.
19. Oriol Valls J, Del Castillo B. Métodos térmicos. Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. Barcelona: Piros, 1985. p. 648-650.
20. Platteau C, Lefebvre J, Hemon S, Affouard F, Willart JF, Derollez P. Ab initio structure determination of two anhydrous forms of α -lactose by powder X-ray diffraction. *Materials structure* 2004;11:58-60.
21. Reyes ME, Hinojosa M. Estructura de sólidos amorfos. *Ingenierías* 2000;9:7-14.

22. Rosenkrantz BE, Greco JR, Hoogerheide JG, Oden EM. Gentamicin sulfate. In: Florey K, editor. Analytical profiles of drug substances, Vol. 9. New York: Academic Press, 1980. p. 310-311.
23. Sakellariou P, Rowe RC, White EFT. Polymer/polymer interaction in blends of ethyl cellulose with both cellulose derivatives and polyethylene glycol 6000. *Int J Pharm* 1986;34:93-103.
24. Sanz Pedrero P. Aspectos generales de las macromoléculas. *Fisicoquímica para farmacia y biología*. Barcelona: Ediciones Científicas y Técnicas, 1992. p. 907-908.
25. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Métodos térmicos. Principios de análisis instrumental*. Madrid: Mc Graw-Hill, 2000. p. 870-874.
26. Suryanarayanan R. X-Ray Powder Diffractometry. In: Brittain HG, editor. *Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 187-221.
27. Torrado S, Frutos P, Frutos G. Gentamicin bone cements: characterisation and release (in vitro and in vivo assays). *Int J Pharm* 2001;217:57-69.
28. Willard HH, Merritt LL Jr, Dean JA, Settle FA Jr. *Análisis térmico. Métodos instrumentales de análisis*. Méjico: Grupo Editorial Iberoamericana, 1991. p. 747-759.

4. INFLUENCIA DE MODULADORES DE CESIÓN EN LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS

4.1. INTRODUCCIÓN

Los materiales en condiciones habituales de utilización están sometidos a fuerzas o cargas; esto les ocurre a los cementos óseos en el lugar del implante. Para garantizar la integridad estructural es necesario conocer las características del material, y diseñar la pieza de tal manera que cualquier deformación resultante no sea excesiva y no se produzca la rotura. La caracterización mecánica nos permite predecir la respuesta del material en función de las cargas aplicadas (Callister, 1995). Así podemos definir la *biomecánica* como la ciencia que estudia las fuerzas y la energía sobre los sistemas biológicos (Munuera, 1996).

Las propiedades mecánicas de los materiales se determinan realizando ensayos controlados en el laboratorio, que tratan de reproducir las condiciones de servicio hasta donde sea posible. Los factores que deben considerarse son la naturaleza de la carga aplicada y su duración, así como las condiciones del medio en que se encuentra el material.

4.1.1. PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS MATERIALES

4.1.1.1. TENSIONES EN UN SÓLIDO

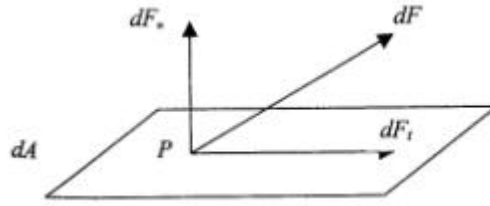
La tensión \mathbf{s} se define mediante la relación:

$$\mathbf{s} = \frac{F}{A_0} \text{ de forma más general } \mathbf{s} = \frac{dF}{dA}$$

en donde dF es el diferencial de la carga instantánea aplicada en un diferencial de superficie, dA , mientras que F es la carga media aplicada sobre una superficie A_0 . En el sistema internacional (SI) la fuerza viene expresada en newtons (N), y A_0 es el área de la sección original antes de aplicar la carga en m^2 . La unidad de tensión en el SI es el pascal (Pa).

Para nuestro trabajo cabe distinguir dos tipos de tensión: normales y de cizalla, como podemos observar en la Fig. 1 (Callister, 1995).

Dado un dF actuando en un punto P de un sólido con superficie diferencial dA , puede descomponerse la fuerza según dos componentes:



$dF_n \Rightarrow$ Perpendicular a la superficie.

$$\frac{dF_n}{dA} = \mathbf{s}_n \Rightarrow \text{Tensión normal o axial.}$$

$dF_t \Rightarrow$ Paralelo a la superficie.

$$\frac{dF_t}{dA} = \mathbf{t} \Rightarrow \text{Tensión tangencial o de cizalla.}$$

Como ejemplo de tensión normal (tracción $\mathbf{s}_n > 0$; compresión $\mathbf{s}_n < 0$).

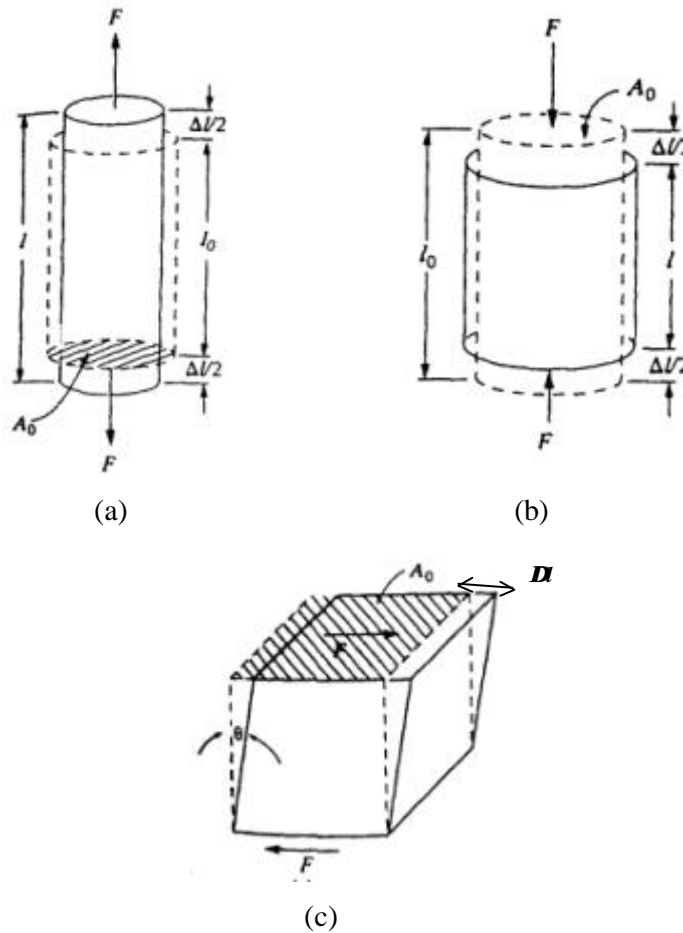


Figura 1. (a) Ilustración esquemática de cómo una carga de tracción produce un alargamiento y una deformación longitudinal positiva. Las líneas discontinuas representan la forma antes de la deformación; las líneas sólidas, después de la deformación. (b) Ilustración esquemática de cómo una carga de compresión produce una contracción y una deformación longitudinal negativa. (c) Representación esquemática de la deformación de cizalladura, \mathbf{g} donde $\mathbf{g} = \tan \mathbf{q}$

4.1.1.2. DEFORMACIONES EN UN SÓLIDO

La *deformación longitudinal o axial* se define como

$$\mathbf{e} = \frac{l_i - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0}$$

en donde l_0 es la longitud original antes de aplicar la carga, y l_i es la longitud después de haberse aplicado la carga. Habitualmente la diferencia $l_i - l_0$ se representa simplemente mediante Δl , que es el alargamiento producido por la fuerza aplicada, o cambio en longitud en un instante determinado, con respecto a la longitud inicial. La deformación es adimensional y suele expresarse en porcentaje.

La *deformación tangencial o de cizalla* se define como

$$\mathbf{g} = \frac{\Delta l}{C}$$

en donde Δl es el cambio en longitud en un instante determinado producido en dirección de las tensiones tangenciales y C es la longitud inicial en dirección perpendicular.

La deformación puede ser elástica o plástica.

Deformación elástica

Cuando se cumple que la deformación es reversible al retirar la tensión aplicada, la deformación se denomina *deformación elástica*.

Forma general de la ley de Hooke- para deformaciones elásticas y lineales

En el caso más general, un elemento de material está sometido a tres tensiones normales perpendiculares entre sí, \mathbf{s}_x , \mathbf{s}_y , \mathbf{s}_z , acompañadas de tres deformaciones \mathbf{e}_x , \mathbf{e}_y , \mathbf{e}_z , respectivamente, análogamente hay tensiones tangenciales, \mathbf{t}_{xy} , \mathbf{t}_{xz} , \mathbf{t}_{yz} , que dan lugar a deformaciones de cizalla \mathbf{g}_y , \mathbf{g}_z , \mathbf{g}_x . La relación general entre tensiones aplicadas y deformaciones producidas viene dada por la ley de Hooke (Ortiz, 1990):

$$\begin{aligned} \mathbf{e}_x &= \frac{1}{E} [\mathbf{s}_x - \mathbf{n}(\mathbf{s}_y + \mathbf{s}_z)] \\ \mathbf{e}_y &= \frac{1}{E} [\mathbf{s}_y - \mathbf{n}(\mathbf{s}_x + \mathbf{s}_z)] \\ \mathbf{e}_z &= \frac{1}{E} [\mathbf{s}_z - \mathbf{n}(\mathbf{s}_x + \mathbf{s}_y)] \end{aligned}$$

$$g_{xy} = \frac{t_{xy}}{G}$$

$$g_{xz} = \frac{t_{xz}}{G}$$

$$g_{yz} = \frac{t_{yz}}{G}$$

E = Módulo de elasticidad (Pa) y ν = Módulo de Poisson (adimensional). Estos dos parámetros son característicos del material.

Cuando un material está sometido a una carga de tracción simple se produce en él un aumento de longitud en la dirección de la carga, así como una disminución de las dimensiones laterales perpendiculares a éste. La relación entre la deformación en la dirección lateral y la de la dirección axial se define como módulo de Poisson.

G = Módulo de cizalladura. Es decir, la pendiente de la región elástica de la curva tensión-deformación de cizalladura.

El módulo de cizalladura y el módulo de elasticidad están relacionados entre sí y con el módulo de Poisson mediante la relación:

$$G = \frac{E}{2(1+\nu)}$$

Comportamiento bajo cargas uniaxiales- en régimen elástico

En el caso de cargas normales solo a lo largo de un eje tenemos que la ley de Hooke se reduce a:

$$s = Ee$$

considerando solamente la deformación en la dirección de la carga.

En la práctica tal como se muestra en la Fig. 2 al representar la tensión en el eje de ordenadas en función de la deformación en el eje de abscisas se obtiene una relación lineal. A partir del límite de elasticidad lineal, el material va a presentar un comportamiento elástico no lineal, (Callister, 1995).

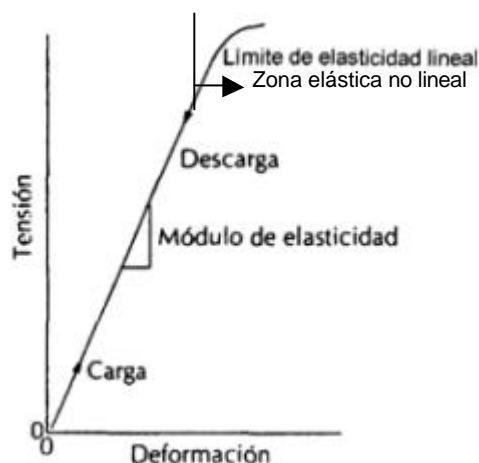


Figura 2. Diagrama esquemático tensión-deformación con deformación elástica para ciclos de carga-descarga.

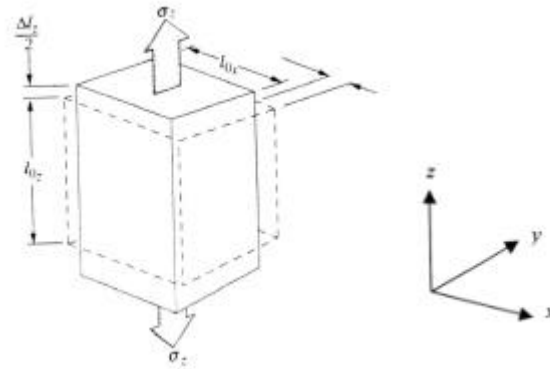
La pendiente de este segmento lineal corresponde al módulo de elasticidad E . Este módulo puede ser interpretado como la rigidez, es decir, la resistencia de un material a la deformación elástica. Cuanto mayor es el módulo, más rígido es el material y menor es la deformación elástica que se origina cuando se aplica una determinada tensión. El módulo es un parámetro de diseño importante utilizado en el cálculo de las deformaciones. Los valores del módulo de elasticidad para los polímeros concretamente para el PMMA varía entre 3,3 y 4,7 GPa (Callister, 1995).

La deformación elástica no es permanente, lo cual significa que cuando se retira la fuerza, la pieza vuelve a su forma original. Tal como se muestra en el diagrama tensión-deformación de la Fig. 2, al retirar la carga, la curva es recorrida en la dirección opuesta volviendo al origen.

Propiedades elásticas de los materiales

Cuando sobre un material se aplica una tracción, se produce un alargamiento en régimen elástico y una deformación \mathbf{e}_z en la dirección de la carga aplicada (la cual se tomará arbitrariamente como la dirección z), tal como se indica en la Fig.3. Como resultado de este alargamiento, se producirán constricciones en las direcciones laterales (x e y) perpendiculares a la dirección de la aplicación de la tensión. A partir de estas contracciones, se pueden determinar las deformaciones de compresión \mathbf{e}_x y \mathbf{e}_y . Se define un parámetro denominado coeficiente de Poisson como el cociente entre las deformaciones laterales y axiales, así:

$$\mathbf{n} = \frac{\mathbf{e}_x}{\mathbf{e}_z} = \frac{\mathbf{e}_y}{\mathbf{e}_z}$$



$$\frac{e_z}{2} = \frac{\Delta_z/2}{l_{0z}} \quad -\frac{e_x}{2} = \frac{\Delta_x/2}{l_{0x}}$$

Figura 3. Alargamiento axial (z) (deformación positiva) y contracciones laterales (x e y) en respuesta a una tracción aplicada. Las líneas continuas representan las dimensiones después de aplicación de la carga; las líneas discontinuas antes.

Teóricamente el *coeficiente de Poisson* para sólidos isotrópicos (en los que las propiedades mecánicas son idénticas, sea cual sea la dirección de aplicación) debe estar entre 0 y un valor máximo de 0,50.

Muchos materiales son estructuralmente anisótropos lo que da lugar a que el comportamiento elástico (y por tanto E) varía según la dirección cristalográfica o microestructura del material. En estos materiales las propiedades elásticas están caracterizadas sólo mediante la especificación de varias constantes elásticas y su número depende de las características de la estructura cristalina o microestructural.

Deformación plástica

Para la mayoría de los materiales sobre todo en los metales, la deformación elástica únicamente persiste hasta deformaciones de alrededor de 0,2%. A medida que el material se deforma más allá de este punto, la tensión deja de ser proporcional a la deformación (la ley de Hooke, deja de ser válida) y ocurre deformación plástica, la cual es permanente, es decir no recuperable. Se denomina *tensión de cedencia* a la tensión a partir de la cual se producen deformaciones permanentes en el material.

La deformación plástica no siempre aparece y muchas veces el material rompe en régimen elástico.

4.1.1.3. CEDENCIA Y LÍMITE ELÁSTICO

La mayoría de las estructuras se diseñan de tal manera que solamente presenten deformación elástica cuando están sometidos a tensiones. Por consiguiente, es deseable conocer el nivel de tensiones para el cual empieza la deformación plástica, es decir, cuando ocurre el fenómeno de cedencia. Para los metales que experimentan la transición elastoplástica de forma gradual, el punto de cedencia puede determinarse como la desviación inicial de la linealidad de la curva tensión-deformación; este punto se denomina *límite proporcional*, y está indicado por P en la Fig. 4. La posición de este punto no puede ser determinada con precisión, ya que hay cierto comportamiento elástico no lineal. Por este motivo se ha establecido una convención por la cual se traza una línea recta paralela al régimen elástico lineal del diagrama de la tensión-deformación desplazada por una determinada deformación, usualmente 0,2%. La tensión correspondiente a la intersección de esta línea con el diagrama tensión - deformación cuando éste se curva se denomina *límite elástico al 0,2%*, $s_{0,2}$ o *límite de tensión de cedencia*. Esto se muestra en la Fig. 4.

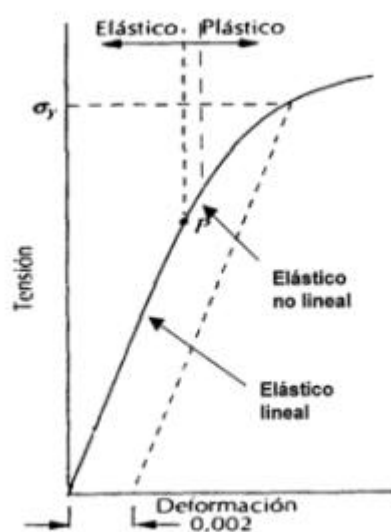


Figura 4. Curva de tracción típica de un metal que muestra las deformaciones elástica y plástica, el límite proporcional P y el límite elástico $s_{0,2}$ determinado como la tensión para una deformación plástica del 0,2%.

4.1.1.4. TENACIDAD

La tenacidad es la capacidad de un material de absorber energía antes de la fractura. La geometría de la probeta así como la manera con que se aplica la carga han de tenerse en cuenta en la determinación de la tenacidad. Además, la tenacidad de fractura es una propiedad que nos indica la resistencia a la fractura.

La resistencia de fractura nos indica la resistencia de un material a que una grieta se propague en su interior (Callister, 1995).

4.1.2. COMPORTAMIENTO TENSIÓN-DEFORMACIÓN EN POLÍMEROS

El comportamiento mecánico de los polímeros se caracteriza con los mismos parámetros utilizados para los metales: módulo elástico, resistencias a la tracción, al impacto, a la fatiga, etc. El ensayo tensión-deformación se emplea para caracterizar parámetros mecánicos de muchos materiales poliméricos. La mayoría de las características mecánicas de los polímeros son muy sensibles a la velocidad de deformación, a la temperatura y a la naturaleza química del medio (presencia de agua, oxígeno, disolventes orgánicos, etc.).

Los materiales poliméricos pueden presentar tres tipos distintos de comportamiento de la curva tensión – deformación, como se representa en la Fig. 5. La curva *A* corresponde al caso de un polímero frágil, ya que se rompe cuando aún está en régimen elástico. El comportamiento del material representado por la curva *B* es parecido al de los metales: después de la deformación elástica inicial el material cede y se deforma plásticamente hasta rotura. Finalmente, el comportamiento descrito por la curva *C* es totalmente elástico, aunque no lineal hasta rotura. Este es el caso de la goma (grandes deformaciones recuperables producidas por pequeños esfuerzos) es propia de los polímeros denominados *elastómeros*.

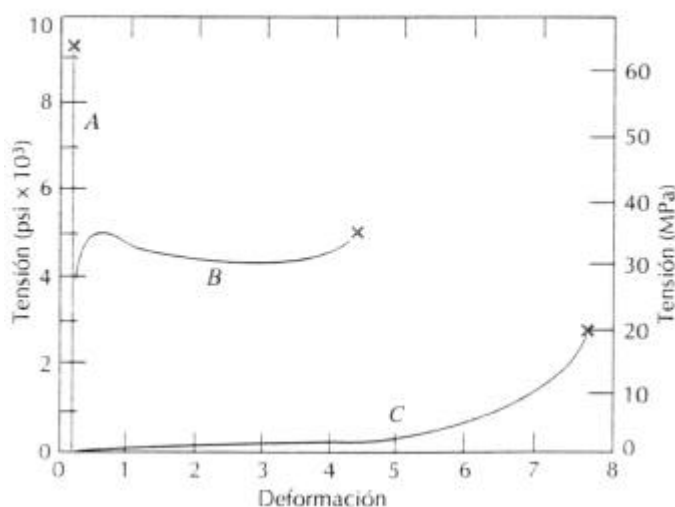


Figura 5. Comportamiento tensión – deformación de los polímeros: frágil (curva A), plástico (curva B) y con elevada elasticidad (elastómero) (curva C).

A los polímeros frágiles como el PMMA (cemento objeto de estudio) se les llama *quebradizos* y a los polímeros plásticos se les llama *dúctiles* (tienen una deformación considerable antes de rotura).

El módulo de elasticidad, la resistencia a la tracción y la ductilidad de los polímeros se determinan como en los metales.

Las características mecánicas de los polímeros son mucho más sensibles a las variaciones de temperatura, en condiciones ambientales, que la de los metales debido a su estructura molecular. Al observar el comportamiento tensión–deformación del polimetacrilato de metilo a temperaturas comprendidas entre 4 y 60 °C, se aprecia que el incremento de temperatura produce: (1) disminución del módulo elástico, (2) disminución de la resistencia a la tracción y (3) aumento de la ductilidad; el polímero es totalmente frágil a 4 °C mientras que a 50 y 60 °C experimenta una considerable deformación plástica (Callister, 1995).

En este trabajo se persiguió determinar las propiedades mecánicas de los cementos óseos comerciales y modificados por nuestro grupo de investigación para dar una respuesta al papel que jugarían como transmisores de las cargas entre el hueso y la prótesis. Para ello se diseñó un plan de trabajo que consistiría en primer lugar en la caracterización mecánica mediante ensayos de tracción, flexión en tres puntos y tenacidad de fractura junto con ensayos de dureza, densidad y porosidad.

4.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Todos los ensayos mecánicos han sido realizados en el laboratorio del Departamento de Ciencia de Materiales de la ETSI de Caminos, Canales y Puertos de la UPM.

Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y en medio seco (20 °C y 30-40% de humedad relativa).

4.2.1. MATERIALES

El primero de los cementos utilizados corresponde con el cemento comercial CMW1[®] Radiopaco suministrado por DePuy Ibérica S.A. Este material corresponde a la denominación CMW1[®] RC, durante todo el trabajo.

El siguiente de los cemento óseos es el mismo pero con la primera de las modificaciones, la reacción de polimerización se lleva a cabo sometido a compresión uniaxial de 500 kPa. Para ello se ejerce una fuerza de 5000 N sobre una superficie de 100x100 mm² en un recipiente rectangular. Dicho recipiente se dispuso en el pistón inferior de una máquina de ensayos y en el superior se había incorporado una placa metálica. Las bases superior e inferior del dispositivo estaban recubiertas de teflón, para evitar que se adhiriera la masa. Su denominación es CMW1[®] RC P.

El CMW1[®] GC P corresponde a un cemento igual al CMW1[®] RC P difiriendo en su composición. Esta incluye gentamicina, antibiótico que tendrán también los restantes cementos empleados. La cantidad es de un 4% en peso, incluida en la composición en forma de polvo junto al componente en polvo del cemento.

Los cementos denominados 10L4G P y 20L4G P son de composición igual al CMW1[®] GC P, pero se ha incluido lactosa en un 10% y 20% en peso respectivamente. También polimerización con presión igual a los casos anteriores.

Por último los cementos 10H4G P y 20H4G P se modificaron de igual manera que los anteriores pero con un 10% y 20% en peso de hidroxipropilmetilcelulosa como excipiente, y polimerización bajo compresión uniaxial de 500 kPa.

Para que durante la lectura del trabajo sea fácilmente identificable con la composición y condiciones de polimerización cada uno de los cementos se resume la información en la Tabla 1.

Tabla 1. *Enumeración de las modificaciones de los distintos cementos ensayados.*

MATERIAL	P (500 kPa)	GENTAMICINA	EXCIPIENTE
CMW1 [®] RC	-	-	-
CMW1 [®] RC P	Si	-	-
CMW1 [®] GC P	Si	4%	-
10L4G P	Si	4%	10% Lactosa
20L4G P	Si	4%	20% Lactosa
10H4G P	Si	4%	10% HPMC
20H4G P	Si	4%	20% HPMC

Se reservó una fracción de las probetas obtenidas de cada oblea de los distintos materiales antes enunciados. Estas probetas reservadas se introdujeron en los reactores de vidrio con medio salino simulando las condiciones del lugar de implante. Se introdujeron cada una de ellas por espacio de 8 semanas. Con esto se persigue ver como afecta el medio biológico a los cementos, desde el punto de vista de la respuesta mecánica. Se dispone, por tanto, de 5 nuevos cementos para caracterizar. Se decidió que la nomenclatura correspondiera a la misma que se ha utilizado para la composición de cada cemento, pero identificando con una E las probetas que habían sido ensayadas en el reactor.

4.2.2. MEDIDAS DE LA DENSIDAD

Para determinar la densidad se utilizó una balanza, Mettler Toledo con una unidad LC-P Density, que permite el cálculo automático de la densidad mediante el método de Arquímedes (Salazar y col., 2003), en un medio de agua destilada, con prismas rectangulares de cada material. Para cada valor obtenido se realizaron un mínimo de cinco medidas por material.

4.2.3. MEDIDAS DE DUREZA

La dureza se midió con un microdurómetro Leco V-100-C, en prismas rectangulares de cada material (Fig. 6), tanto en las zonas paralelas a las de aplicación de la presión en la obtención como las perpendiculares.

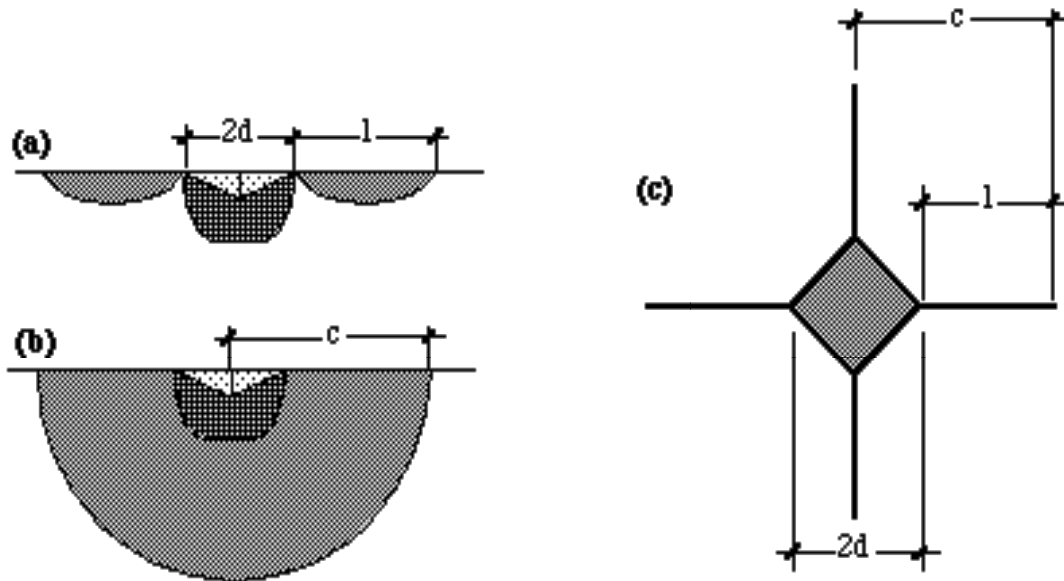


Figura 6. Grietas superficiales generadas con una punta Vickers. (a) Sección a lo largo de una diagonal a bajo nivel de carga. (b) Sección a lo largo de una diagonal a alto nivel de carga. (c) Vista normal a la superficie.

La dureza se caracterizó aplicando una carga de 98 N durante 20 s y después se procedió a la medida de las diagonales del prisma indentado en el material. El valor de la dureza se obtuvo como la medida de, al menos, cinco medidas de las longitudes diagonales. El cálculo se hizo según la ecuación:

$$H = \frac{F}{2d^2}$$

Donde F es la fuerza aplicada y $2d$ es el valor de la diagonal.

4.2.4. MEDIDAS DE POROSIDAD

La porosidad de los cementos se determinó por porosimetría de intrusión de mercurio (Micromeritics Pore Sizer 9305, Norcross, GA, USA). Las muestras se introdujeron completamente secas dentro del porosímetro de baja presión, donde se desgasificaron. El volumen de penetración de mercurio se registró posteriormente mientras la presión de intrusión aumentaba. Las muestras se sacaron de la unidad de baja presión y se introdujeron en el porosímetro de alta presión. El volumen de penetración de mercurio se registró mientras que la presión de intrusión aumentaba a 25.000 psia.

La porosidad total se calculó a partir del volumen de intrusión total mientras que el diámetro de poro se calculó de acuerdo a la ecuación de Washburn (Joschek y col., 2000), (Mehta y col., 2000):

$$D = \frac{-4g \cos \theta}{P}$$

donde D es el diámetro de poro (μm); g la tensión superficial de mercurio (485 dyn cm^{-1}); θ el ángulo de contacto (130°); y P es la presión (psia).

Las muestras utilizadas en este ensayo se elaboraron usando las condiciones de trabajo más parecidas a las que se utilizan en su administración clínica, es decir sin aplicar presión. Para cada valor obtenido se realizaron tres medidas por material.

4.2.5. ENSAYOS DE TRACCIÓN

Los ensayos de tracción se llevaron a cabo en una máquina servo-hidráulica (8501 Instron) (Fig. 7) sobre probetas de tracción directa, en la Fig. 8 se muestra un croquis de las mismas. La carga aplicada se midió en una célula de carga de $\pm 1 \text{ kN}$ y el desplazamiento con un LVDT (linear variable displacement transducers) de recorrido $\pm 1 \text{ mm}$. También se colocó un extensómetro Instron con apertura de patillas $\pm 2,5 \text{ mm}$ y $12,5 \text{ mm}$ de base de medida. Las probetas se sujetaron con un sistema de mordazas mecánicas Instron, sin utilizar tacones de goma en los amarres. Antes de colocar la probeta para ensayo se tomaron las medidas de la misma con un calibre. La toma de datos se realizó con el programa de toma digital de adquisición de datos, Wave Maker, en un PC, donde quedaron registrados los valores de tiempo, fuerza, desplazamiento y deformación. El ensayo se hizo a velocidad de desplazamiento constante de $500 \mu\text{m}/\text{min}$ y temperatura ambiente.

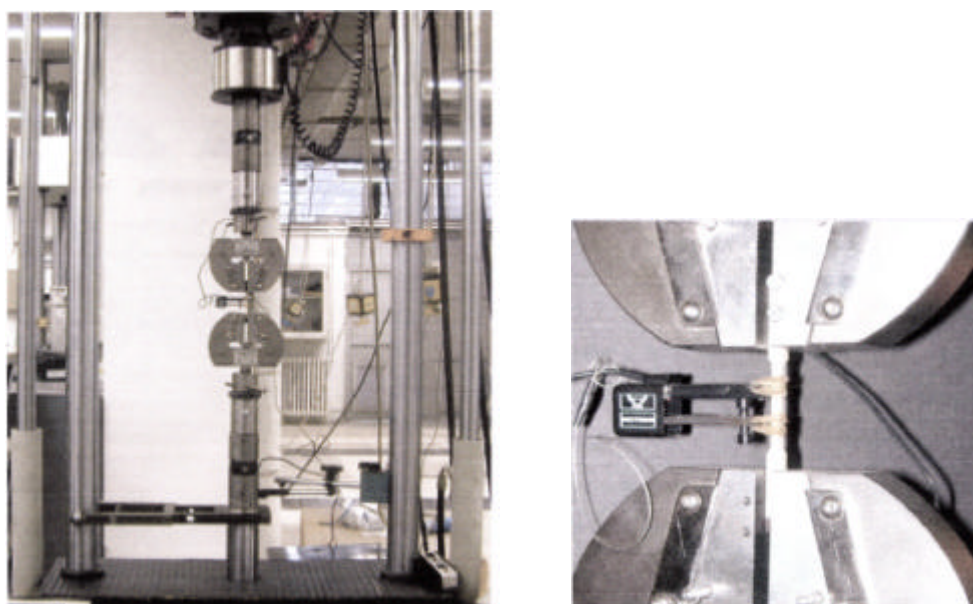


Figura 7. *Ensayos de tracción y detalle de las mordazas y el extensómetro.*

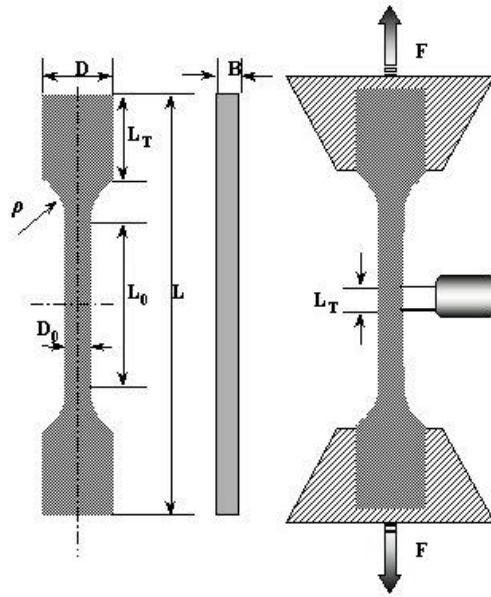
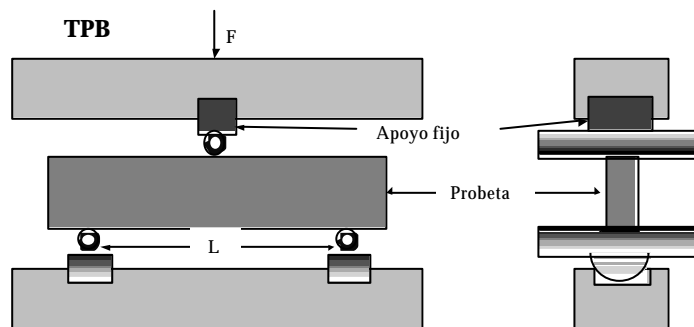


Figura 8. Croquis de las probetas de tracción.

4.2.6. ENSAYOS DE FLEXIÓN EN TRES PUNTOS

Se realizaron al igual que en el caso de tracción con una máquina servohidráulica Instron 8501, sobre probetas en forma de viga de sección rectangular. Todas las medidas de las probetas se tomaron antes de realizar cada uno de los ensayos con un calibre. La distancia entre apoyos fue de unos 20 mm. La célula de carga era ± 1 kN y el LVDT de ± 1 mm que registraba el desplazamiento. El dispositivo constaba de tres cilindros de material cerámico de gran dureza y rigidez, y dos prismas rectangulares como apoyos fijos de dicho material. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente. En la Fig. 9 se puede ver una fotografía tomada durante uno de los ensayos y el croquis de colocación de los apoyos y la probeta. La velocidad de desplazamiento era igual a $100 \mu\text{m}/\text{min}$ y los datos de tiempo, fuerza y desplazamiento quedaron registrados en un PC como en el caso anterior.



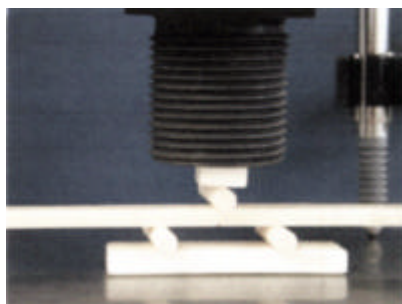


Figura 9. Croquis y fotografía de los ensayos de flexión en tres puntos.

4.2.7. ENSAYOS DE FRACTURA

Los ensayos de tenacidad de fractura se llevaron a cabo en probetas de iguales dimensiones y geometría que las utilizadas en ensayos de flexión en tres puntos. En este caso se les realizó una entalla en “U” con una cortadora de hilo de diamante, siendo el diámetro de la entalla resultante de 340 μm . En la Fig. 10 se pueden ver las entallas fotografiadas en el microscopio óptico.

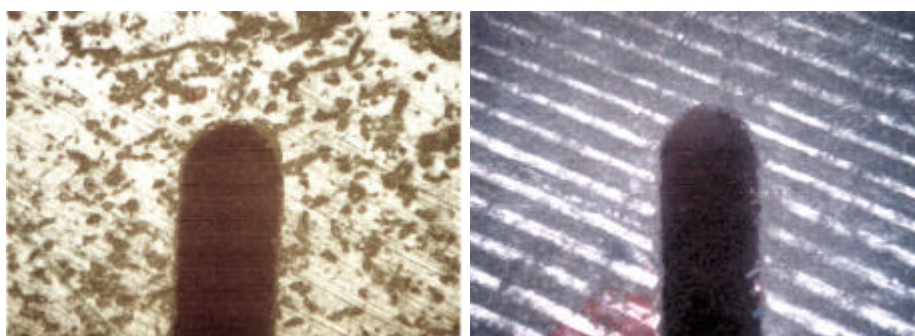


Figura 10. Fotografías de entallas realizadas en las probetas. Microscopio óptico.

Los ensayos se realizaron con igual procedimiento que el de flexión en tres puntos, quedando registrados los valores de fuerza frente a desplazamiento. En la Fig. 11 se pueden ver distintos momentos de uno de los ensayos.

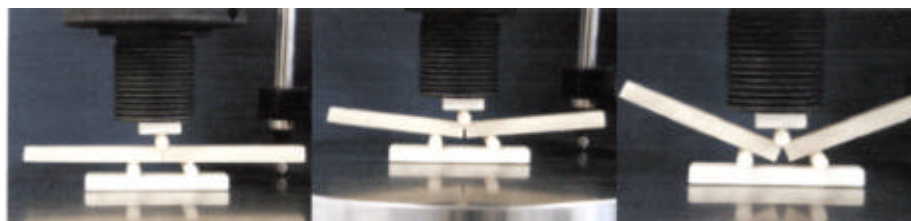


Figura 11. Distintas etapas de un ensayo de tenacidad de fractura.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. MEDIDAS DE LA DENSIDAD

Los resultados obtenidos al medir la densidad por el método de Arquímedes, fueron los que se reflejan en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de los resultados de la densidad. Valor medio \pm desviación estándar.

MATERIAL	ρ (g/cm³)
CMW1 [®] RC	1,1860 \pm 0,0002
CMW1 [®] RC P	1,2442 \pm 0,0060
CMW1 [®] GC P	1,2431 \pm 0,0004
CMW1 [®] GC P E ^a	1,2256 \pm 0,0003
10L4G P	1,2400 \pm 0,0010
10L4G P E ^a	1,2194 \pm 0,0010
20L4G P	1,2637 \pm 0,0005
20L4G P E ^a	1,2301 \pm 0,0003
10H4G P	1,2378 \pm 0,0006
10H4G P E ^a	1,2217 \pm 0,0005
20H4G P	1,1736 \pm 0,0070
20H4G P E ^a	1,2156 \pm 0,0009

^a Material ensayado en el reactor.

En la Fig. 12 se puede ver que no hay diferencias sustanciales en los valores de densidad de los distintos cementos óseos. Estos cementos presentan una densidad media de 1,22 g/cm³, este valor es inferior a la densidad del hueso, ya que el hueso posee de 2,20 g/cm³ en las zonas más ligeras a 2,94 g/cm³ en las densas (Fung, 1993). Por otro lado si comparamos la densidad del material CMW1[®] RC y CMW1[®] RC P se puede ver que la densidad del material aumenta al aplicar presión uniaxial durante la polimerización del material.

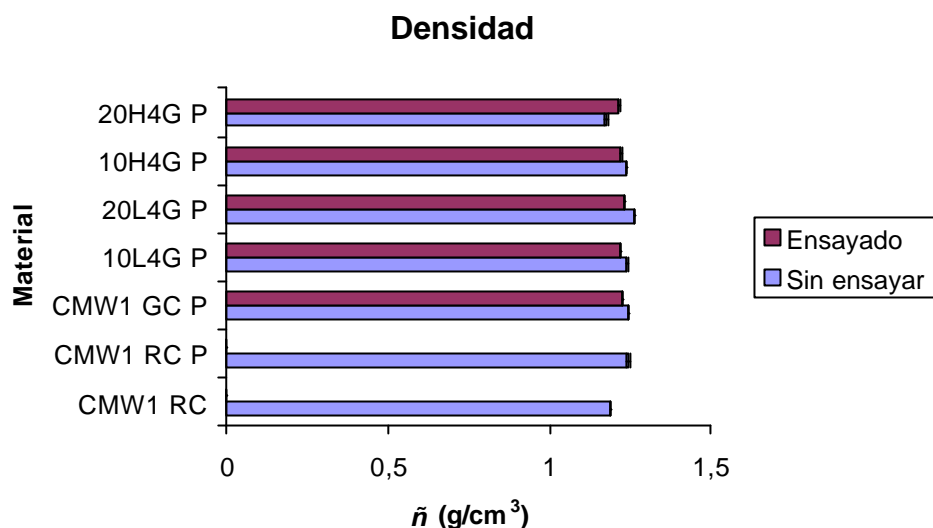


Figura 12. Gráfico de barras de los valores de densidad de todos los materiales ensayados en el reactor y sin ensayar.

4.3.2. MEDIDAS DE DUREZA

La dureza de los distintos materiales sometidos a estudio, se determinó en la dirección en la que se ejercía la presión durante la polimerización, así como en su perpendicular. Dirección transversal (T) y longitudinal (L) respectivamente.

Los valores de dureza que se obtuvieron se representan en la Tabla 3 y en la Fig. 13.

Los resultados indican que en dirección transversal la dureza es superior en comparación con la dureza en dirección longitudinal, en todos los cementos sometidos a presión durante la polimerización, tanto para cementos sin ensayar como los ensayados en el reactor de cesión. En los cementos ensayados en el reactor la dureza es menor que en los cementos no ensayados, excepto en los cementos que contienen HPMC donde en dirección longitudinal la dureza es mayor en los cementos sometidos al ensayo de cesión.

Tabla 3. Resumen de los resultados de la dureza. Valor medio \pm desviación estándar.

MATERIAL	H_T (GPa)	H_L (GPa)
CMW1 [®] RC	1,95 \pm 0,05	2,04 \pm 0,06
CMW1 [®] RC P	2,03 \pm 0,02	1,81 \pm 0,02
CMW1 [®] GC P	2,12 \pm 0,04	1,57 \pm 0,03
CMW1 [®] GC P E ^a	1,52 \pm 0,01	1,41 \pm 0,01
10L4G P	1,93 \pm 0,05	1,70 \pm 0,09
10L4G P E ^a	1,45 \pm 0,01	1,41 \pm 0,03
20L4G P	1,67 \pm 0,05	1,53 \pm 0,05
20L4G P E ^a	1,52 \pm 0,04	1,25 \pm 0,04
10H4G P	1,94 \pm 0,02	1,24 \pm 0,02
10H4G P E ^a	1,81 \pm 0,06	1,52 \pm 0,02
20H4G P	1,71 \pm 0,04	1,35 \pm 0,03
20H4G P E ^a	1,60 \pm 0,20	1,55 \pm 0,20

^a Material ensayado en el reactor.

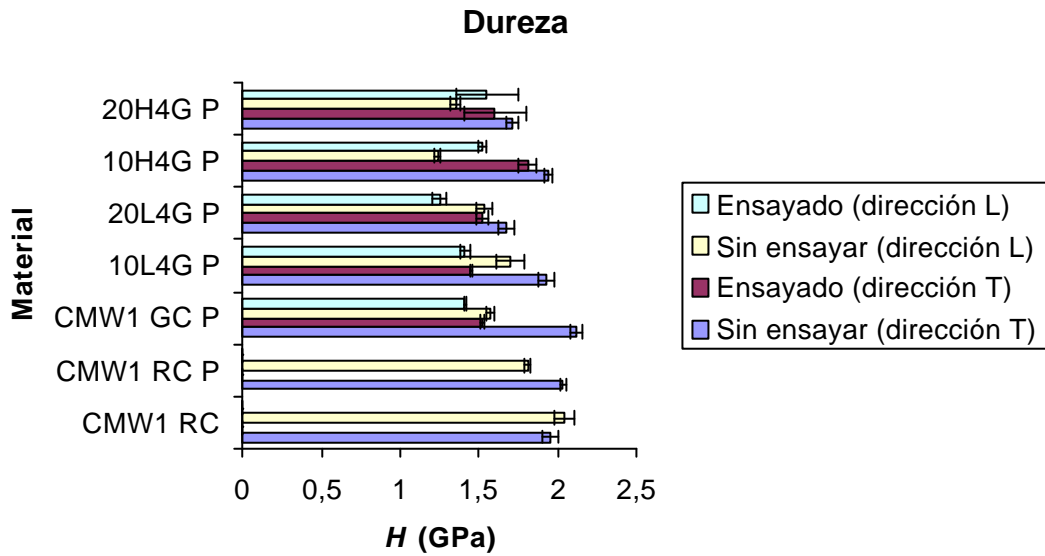


Figura 13. Gráfico de barras de los valores de dureza de todos los materiales ensayados en el reactor y sin ensayar. Dirección T (paralela a la presión), dirección L (perpendicular a la dirección en la que se ejerce presión durante la polimerización).

4.3.3. MEDIDAS DE POROSIDAD

Ha sido estudiada la porosidad de los materiales obteniéndose como resultados el porcentaje de porosidad y el diámetro medio de poro como se puede ver en la Tabla 4. Ninguna de las muestras se ha sometido a presión durante la polimerización por lo que la muestra CMW1® RC P se elimina de este estudio porque es igual que la muestra CMW1® RC pero con presión. Debido a esto la nomenclatura de estas muestras se modifica, denominándose de la misma manera que en los estudios anteriores pero sin la sigla P (presión). En la Fig. 14 se presenta el gráfico con los datos de la porosidad media.

Las causas de la porosidad que aparece en los cementos comerciales son principalmente cuatro (Friis y col., 1993), (Scheurs y col., 1988), (Wixson y col., 1987): i) el aire que inicialmente se encuentra entre el monómero líquido y los constituyentes del polvo; ii) introducción de aire durante la mezcla del polvo con el monómero líquido; iii) la evaporación del monómero volátil, durante el proceso de curado y por último iv) que durante el proceso de transferencia del cemento a la jeringa utilizada para administrar el cemento en la zona de tratamiento, se puede producir la formación de oclusiones de aire. En los cementos modificados en nuestro laboratorio con la lactosa y la HPMC existe otra causa de porosidad debida a la disolución de estos excipientes que forma poros y grietas en la matriz del cemento favoreciendo la cesión de gentamicina.

La presencia de poros en el cemento en el canal intramedular puede tener efectos tanto positivos como negativos en la estabilidad de la artroplastia. Por un lado se espera intuitivamente que los poros grandes actúen como concentradores de tensiones, zonas de comienzo de grietas, confiriendo al cemento una mayor susceptibilidad a la fractura por fatiga. Pero por otro lado Topoleski (Topoleski y col., 1993) propone que los poros pequeños pueden actuar enromando las grietas, y por lo tanto prolongando la vida del implante.

Como se puede ver en la Tabla 4, el diámetro medio de poro de estos cementos está comprendido entre 13-31 nm por lo que en estos materiales predominan los mesoporos (Sing y col., 1985). Este diámetro medio es mayor en aquellas formulaciones que contienen HPMC como modulador de la cesión, siendo mayor al aumentar el porcentaje de HPMC, ya que la HPMC hace que el material presente una superficie irregular produciendo poros de mayor tamaño. Además las muestras de HPMC sometidas al ensayo de cesión presentan un mayor diámetro que las muestras no ensayadas, ya que al disolverse la HPMC produce poros de mayor tamaño.

La introducción en el cemento del antibiótico no aumenta la porosidad y no modifica el tamaño de poro mayoritario.

La porosidad media es siempre mayor en las formulaciones sometidas al ensayo de disolución si las comparamos con las formulaciones iniciales correspondientes, debido a la disolución de los excipientes y de la gentamicina.

La porosidad de las formulaciones con lactosa antes de los ensayos de disolución disminuye a medida que aumenta el porcentaje de lactosa. Este hecho es probablemente debido al gran tamaño de estas partículas así como a la forma poliédrica, que puede favorecer el empaquetamiento de los mismos produciendo una porosidad menor. Sin embargo, los datos de porosidad de los cementos sometidos al ensayo de disolución presentan una relación directa entre el aumento del porcentaje de lactosa y el aumento de porosidad, debido a la disolución de la lactosa y a la formación de una matriz porosa de cemento óseo.

Las formulaciones con HPMC, antes y después de los estudios de disolución, presentan una porosidad más alta que el resto de las formulaciones. Este hecho se atribuye a que las formulaciones con HPMC presentan una superficie escamosa muy irregular de forma que las grietas que quedan entre estas estructuras escamosas provocan un considerable incremento de la porosidad.

Tabla 4. Resumen de los resultados de porosidad. Valor medio \pm desviación estándar.

MATERIAL	POROSIDAD (%)	DIÁMETRO MEDIO (mm)
CMW1 [®] RC	5,21 \pm 0,02	13,30 \pm 0,95
CMW1 [®] GC	5,57 \pm 0,03	14,07 \pm 0,26
CMW1 [®] GC E ^a	6,00 \pm 0,02	13,16 \pm 0,14
10L4G	7,04 \pm 0,01	13,25 \pm 0,21
10L4G E ^a	7,15 \pm 0,01	13,53 \pm 0,17
20L4G	4,67 \pm 0,04	14,54 \pm 0,17
20L4G E ^a	9,30 \pm 0,08	14,66 \pm 0,12
10H4G	8,20 \pm 0,02	17,29 \pm 0,18
10H4G E ^a	21,70 \pm 0,05	30,98 \pm 0,14
20H4G	12,55 \pm 0,02	24,79 \pm 0,15
20H4G E ^a	20,29 \pm 0,04	31,33 \pm 0,12

^a Material ensayado en el reactor.

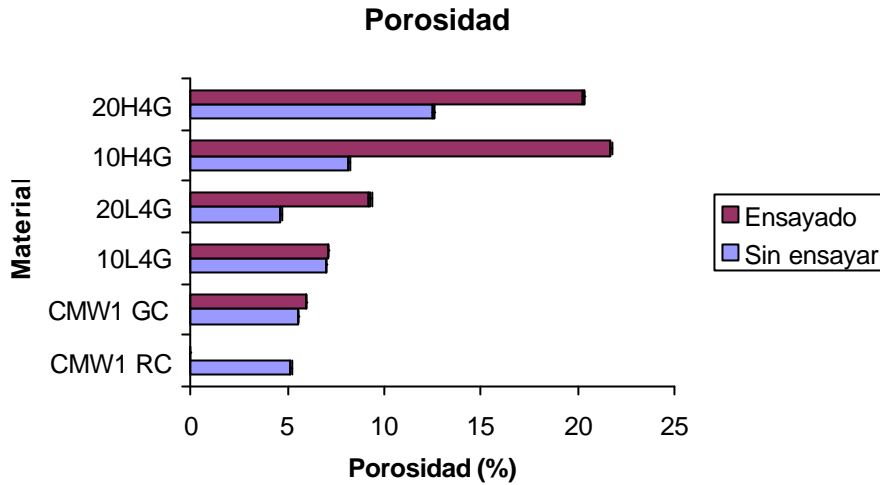


Figura 14. Gráfico de barras de los resultados obtenidos para la porosidad media de todos los materiales ensayados en el reactor y sin ensayar.

4.3.4. RESISTENCIA A TRACCIÓN

La resistencia a tracción máxima de cada material se obtiene de los ensayos uniaxiales de tracción, en los que se registran la fuerza, el desplazamiento y la deformación. Con los resultados obtenidos podemos representar las gráficas de la tensión máxima frente a deformaciones sin más que dividir la fuerza entre el área de cada probeta y las deformaciones se obtienen del registro del extensómetro. Un ejemplo de las gráficas obtenidas se representa en la Fig. 15. Como cabía esperar su representación da lugar a curvas mayoritariamente lineales, por ser materiales frágiles. El máximo valor de la tensión registrado es el que se quiere determinar. Estos ensayos se realizaron siguiendo las normas internacionales (ASTM C496) en al menos tres probetas de cada material, obteniendo un valor medio.

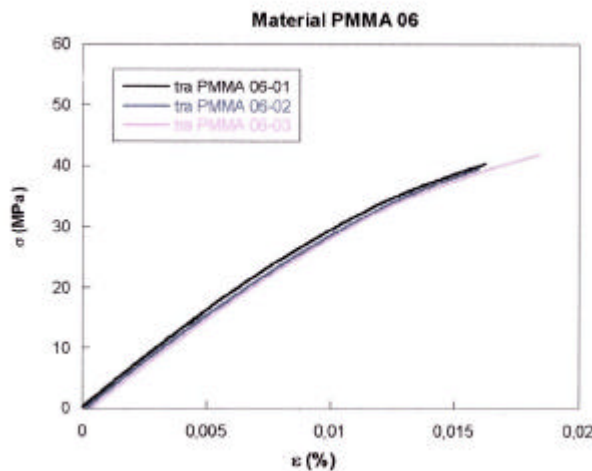


Figura 15. Gráfica obtenida de los ensayos de tracción para el 10H4G P.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5 y en la Fig. 16.

El primer dato que sobresale de todos los registrados en la gráfica y en la tabla son los valores de la resistencia a tracción de los cementos óseos, inferiores a los del PMMA comercial (50-80 MPa) en prácticamente todos los casos (Callister, 1995). Partiendo de esta premisa se observa como la introducción de la presión durante la polimerización del cemento conlleva un aumento del valor de la tensión máxima de tracción. Esto es lógico que ocurra puesto que, el paso de un proceso completamente manual a cierta normalización inducida por la presión uniaxial, presupone cierta disminución del número de porosidades presentes, y defectos en la formación del cemento.

El siguiente paso fue la introducción de antibiótico en la formulación del cemento con lo que se añadía un impedimento estérico a la polimerización. ¿Implicaría esto demasiado obstáculo a la formación de las cadenas poliméricas? Aunque la gentamicina sea un compuesto orgánico (aminoglucósido), el resultado nos hace pensar que no, puesto que la tensión máxima de tracción es inferior tan solo en 2 MPa, lo que entra dentro del error experimental de los resultados, que es similar en ambos casos. Esto además concuerda con los datos obtenidos en calorimetría diferencial de barrido (DSC) en el Capítulo 3, donde se observó que no se produce ninguna incompatibilidad entre los distintos componentes del cemento.

Los siguientes cuatro cementos estudiados (10L4G P, 20L4G P, 10H4G P, 20H4G P), cuya variación es la composición, dan como resultados valores inferiores a los obtenidos con los cementos comerciales, para la resistencia a tracción. Usando como excipiente la lactosa la resistencia es menor, aunque un aumento de la concentración de esta, no nos lleva al efecto directo de disminución de la tensión máxima en tracción, parece existir una cierta “saturación”. En el caso de los cementos 10H4G P y 20H4G P donde el excipiente añadido fue la HPMC la disminución del valor de tensión máxima en tracción es menor, que en el caso de los cementos modificados con lactosa, respecto del material CMW1[®] GC P en el que ya se había introducido la gentamicina y polimerizado bajo presión.

Con esta primera incursión en el comportamiento de los cementos óseos según la composición se da un paso más adelante y se ve que ocurre cuando estos cementos son sometidos al ensayo de cesión durante ocho semanas.

Todos los valores de la tensión máxima en tracción disminuyen respecto a los valores anteriormente dados. Las variaciones oscilan entre el 10 y el 35%. El alargamiento hasta rotura apenas si varía de los cementos sin ensayar a los mismos una vez pasaron por el reactor, como se puede ver en la Fig. 17.

Tabla 5. Resumen de los resultados de los ensayos de tracción. Valor medio \pm desviación estándar.

MATERIAL	$S_u^{trac.}$ (MPa)
CMW1 [®] RC	38 \pm 2
CMW1 [®] RC P	52 \pm 1
CMW1 [®] GC P	50 \pm 2
CMW1 [®] GC P E ^a	41 \pm 5
10L4G P	29 \pm 2
10L4G P E ^a	26 \pm 6
20L4G P	29 \pm 3
20L4G P E ^a	26 \pm 1
10H4G P	40 \pm 1
10H4G P E ^a	31 \pm 1
20H4G P	34 \pm 1
20H4G P E ^a	22 \pm 1

^a Material ensayado en el reactor.

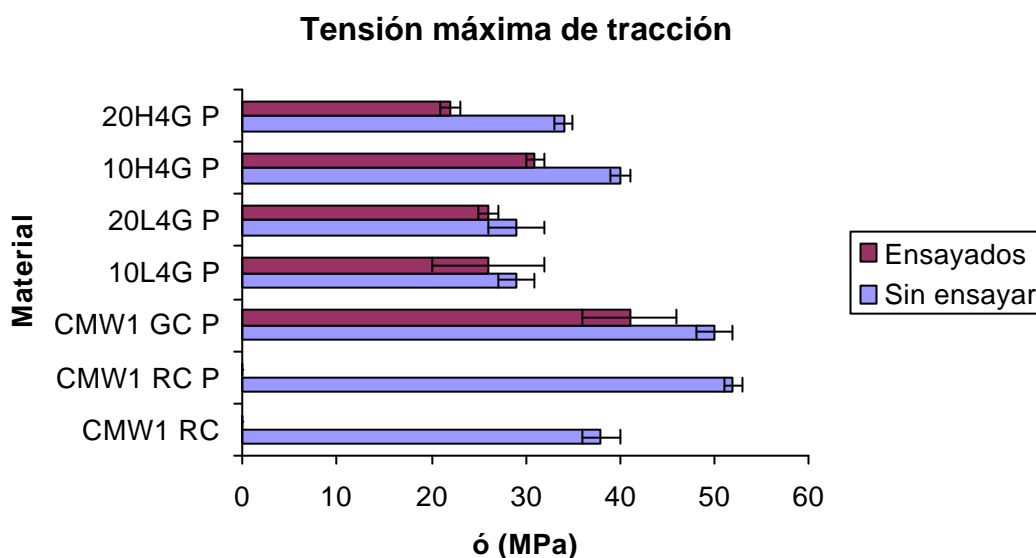


Figura 16. Gráfico de barras de los resultados obtenidos para la tensión máxima en tracción de todos los cementos estudiados.

En las curvas obtenidas de los ensayos experimentales, Fig. 17, se puede observar que la zona de comportamiento lineal, mostrada por los cementos que se les ha realizado el ensayo de cesión, es mucho menor que la de los cementos que no se les ha realizado dicho ensayo. Esto es, el comportamiento lineal de los materiales se exhibe sólo a muy bajas deformaciones. Los cementos óseos tras estar en contacto con el medio de disolución sufren por lo tanto cierta plastificación.

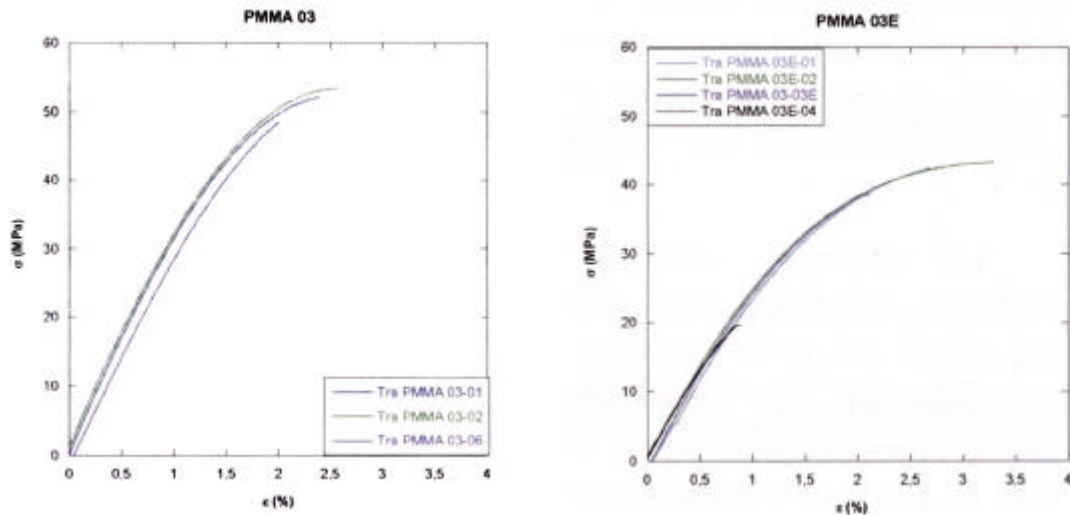


Figura 17. Representación de las curvas obtenidas en los ensayos de tracción para los cementos óseos $CMWI^{\circ}GC P$ y $CMWI^{\circ}GC P E$.

4.3.5. MODULO DE ELASTICIDAD

Del ensayo de tracción y con las gráficas como las que se representan en la Fig. 15 y 17, se realiza en la primera zona, la lineal, un ajuste por mínimos cuadrados cuya pendiente corresponderá con el módulo de elasticidad del material. Se toma como valor representativo para cada material ensayado la media de las pendientes.

Los resultados que a continuación se representan en la Tabla 6 y en la Fig. 18 nos indican a primera vista, que los valores del módulo elástico para la mayoría de los cementos óseos son menores que para el PMMA comercial (3,3-4,7) (Fried, 1995).

El cemento óseo sin ninguna modificación presenta un módulo elástico muy parecido al del PMMA comercial 3,3 GPa, que se ve ligeramente aumentado al introducir la presión en la reacción de polimerización. Cuando se modifica la composición en mayor medida con los excipientes los cambios registrados tampoco son demasiado grandes.

Cuando a los cementos se les ha realizado el ensayo de cesión, sus módulos bajan respecto a los que mostraban con anterioridad. Este comportamiento es lógico, ya que como se había notado antes en las curvas de tracción de los cementos sobre los que se realizaron ensayos de cesión, había disminuido la zona lineal produciéndose una mayor plastificación.

Tabla 6. Resumen de los resultados obtenidos en los módulos de elasticidad. Valor medio \pm desviación estándar.

MATERIAL	E (GPa)
CMW1 [®] RC	3,1 \pm 0,10
CMW1 [®] RC P	3,3 \pm 0,10
CMW1 [®] GC P	2,9 \pm 0,10
CMW1 [®] GC P E ^a	2,6 \pm 0,10
10L4G P	2,7 \pm 0,10
10L4G P E ^a	2,4 \pm 0,09
20L4G P	3,6 \pm 0,10
20L4G P E ^a	2,4 \pm 0,10
10H4G P	3,1 \pm 0,10
10H4G P E ^a	2,3 \pm 0,10
20H4G P	3,6 \pm 0,10
20H4G P E ^a	2,6 \pm 0,10

^a Material ensayado en el reactor.

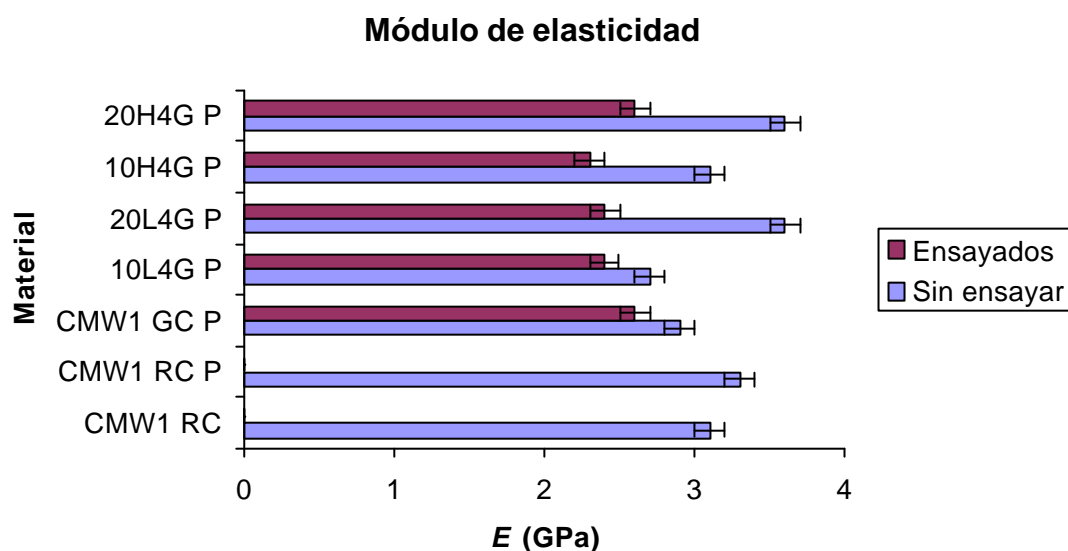


Figura 18. Gráfico de barras de los resultados de los módulos elásticos obtenidos para los distintos cementos óseos.

4.3.6. RESISTENCIA A FLEXIÓN

Los resultados se representan en la Tabla 7 y como en los casos anteriores, mediante un diagrama de barras que nos permite comparar descriptivamente, los resultados de los cementos óseos antes y después de los ensayos de cesión (Fig. 19).

Las tensiones de resistencia a flexión en tres puntos son mayores que las de tracción para los mismos cementos en todos los casos. La introducción de la presión durante la polimerización aumenta el valor de la resistencia a flexión en un porcentaje parecido al que lo hacía en la máxima resistencia a tracción. El resto de valores sigue el patrón de resistencia a tracción.

Tabla 7. Resumen de los resultados de la resistencia a flexión. Valor medio \pm desviación estándar.

MATERIAL	$S_u^{flex.}$ (MPa)
CMW1 [®] RC	63 \pm 2
CMW1 [®] RC P	82 \pm 2
CMW1 [®] GC P	78 \pm 2
CMW1 [®] GC P E ^a	62 \pm 1
10L4G P	54 \pm 2
10L4G P E ^a	46 \pm 2
20L4G P	55 \pm 3
20L4G P E ^a	39 \pm 2
10H4G P	62 \pm 1
10H4G P E ^a	44 \pm 2
20H4G P	49 \pm 4
20H4G P E ^a	40 \pm 4

^a Material ensayado en el reactor.

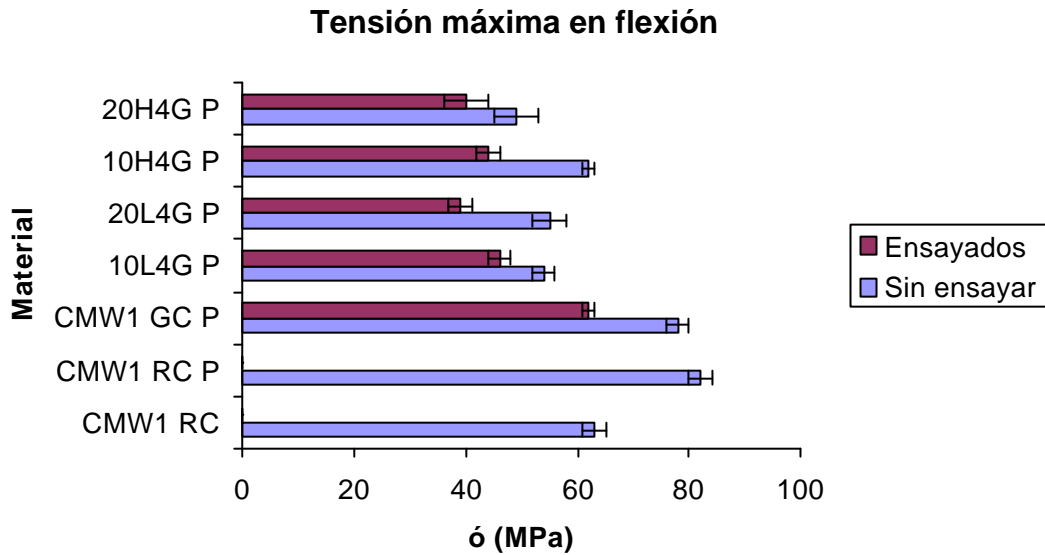


Figura 19. Gráfico de barras de los resultados de máxima tensión en flexión obtenidos para los distintos cementos óseos.

4.3.7. TENACIDAD DE FRACTURA (K_{IC})

Se persigue con la caracterización de este parámetro del material, determinar la capacidad de los cementos óseos de soportar cargas en presencia de defectos. Se obtienen de los ensayos en laboratorio las curvas de fuerza versus desplazamiento (Fig. 21), se presenta una zona de deformación elástica seguida de la zona donde comienza la iniciación de propagación de la grieta, y su posterior crecimiento, hasta su propagación en toda la superficie del ligamento. Los resultados obtenidos en este ensayo se recogen en la Tabla 8 y en la Fig. 20.

El PMMA ofrece un valor entorno a 1 MPa \sqrt{m} para el K_{IC} (Fried, 1995). Los cementos óseos sin haber pasado por el ensayo de cesión superan en un 20% aproximadamente de media este valor. El K_{IC} no se ve influido en exceso por los cambios en las composiciones del material pero si

se ve influido por el ensayo de cesión, así las muestras que han sido sometidas al ensayo de cesión presentan menor valor de K_{IC} , con disminuciones del 10 al 30%.

Tabla 8. Resumen de los resultados de los ensayos de tenacidad de fractura. Valor medio \pm desviación estándar.

MATERIAL	K_{IC} (MPa \sqrt{m})
CMW1 [®] RC	1,28 \pm 0,02
CMW1 [®] RC P	1,21 \pm 0,09
CMW1 [®] GC P	1,21 \pm 0,10
CMW1 [®] GC P E ^a	1,08 \pm 0,80
10L4G P	1,31 \pm 0,03
10L4G P E ^a	1,06 \pm 0,05
20L4G P	1,19 \pm 0,09
20L4G P E ^a	0,82 \pm 0,03
10H4G P	1,20 \pm 0,10
10H4G P E ^a	1,07 \pm 0,05
20H4G P	1,00 \pm 0,10
20H4G P E ^a	0,85 \pm 0,03

^a Material ensayado en el reactor.

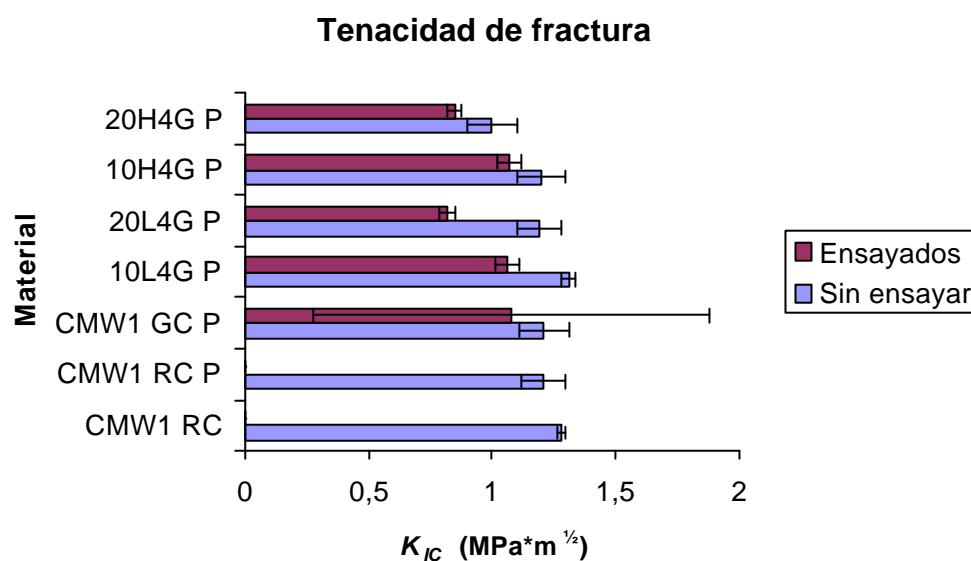


Figura 20. Gráfico de barras de los resultados de los ensayos de tenacidad de fractura obtenidos para los distintos cementos óseos.

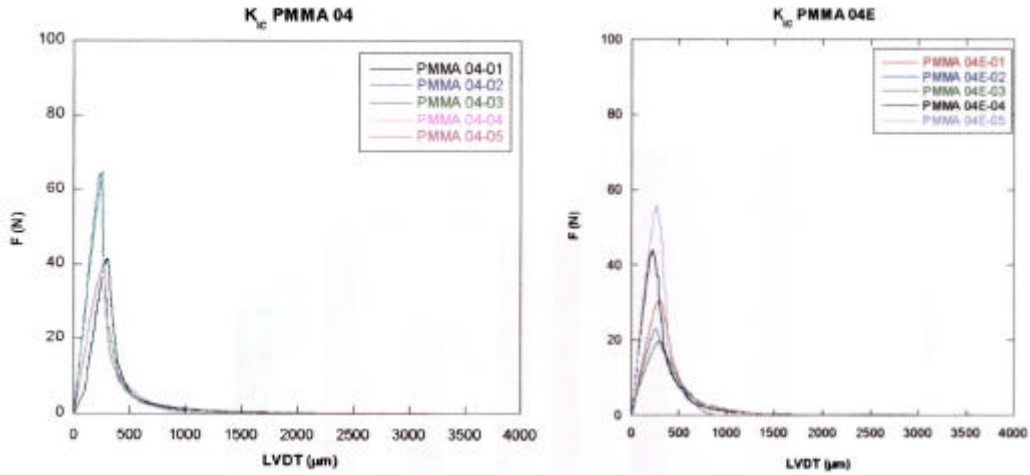


Figura 21. Gráficas obtenidas para los ensayos de tenacidad de fractura para el 10LAG P y 10LAG P E.

4.3.8. ENERGÍA DE FRACTURA (G_F)

Con los mismos ensayos de los que extraemos valores para el K_{IC} , podemos calcular el valor de la energía específica de la fractura. Esta queda definida por el área que encierra la curva fuerza–desplazamiento, Fig. 21, dividido por el producto de la longitud del ligamento por el espesor de la probeta. Del cálculo se obtienen los valores representados en la Tabla 9 y en la Fig. 22.

En la Fig. 22 se observa el aumento de la energía de fractura en las muestras en las que se les ha realizado el ensayo de cesión. El prensado durante la sinterización solo aumenta ligeramente su valor (se puede considerar prácticamente constante si consideramos los intervalos de error). Por el contrario, la presencia de gentamicina en el cemento óseo reduce muy apreciablemente (un 20%) su energía específica de fractura, debido a la introducción de un elemento más frágil. El efecto opuesto se consigue con la adición de lactosa. La energía específica de fractura llega a un máximo para un 10% de lactosa, que probablemente está funcionando como plastificante del material, y por tanto contribuyendo al aumento de G_F .

Tabla 9. Resultados obtenidos para la energía de fractura. Valor medio \pm desviación estándar.

MATERIAL	G_F (N/m)
CMW1 [®] RC	570 \pm 20
CMW1 [®] RC P	608 \pm 59
CMW1 [®] GC P	476 \pm 96
CMW1 [®] GC P E ^a	678 \pm 65
10L4G P	805 \pm 37
10L4G P E ^a	856 \pm 126
20L4G P	722 \pm 50
20L4G P E ^a	813 \pm 55
10H4G P	603 \pm 51
10H4G P E ^a	827 \pm 28
20H4G P	590 \pm 19
20H4G P E ^a	767 \pm 42

^a Material ensayado en el reactor.

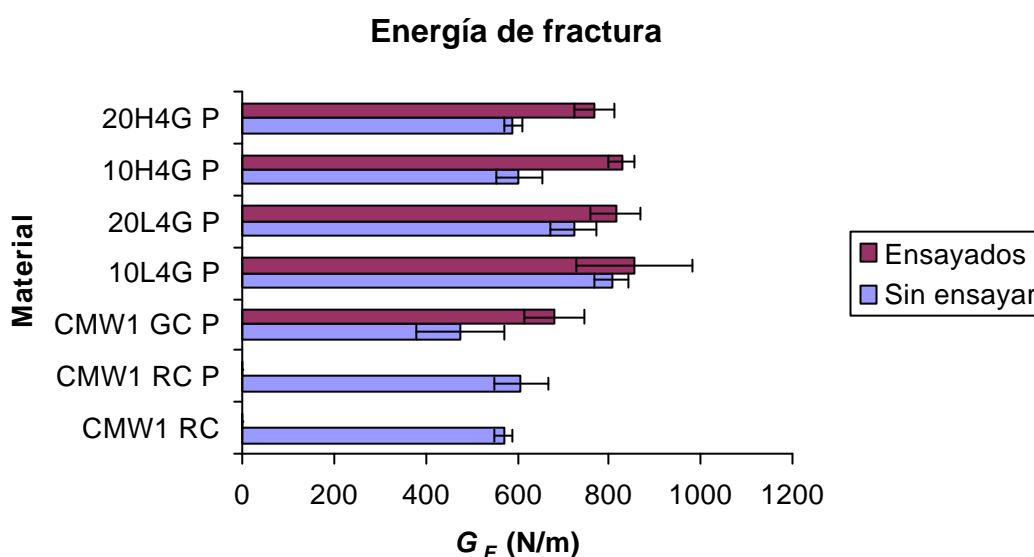


Figura 22. Gráfico de barras de los resultados de energía de fractura obtenidos para los distintos cementos óseos.

4.3.9. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos, que se han mostrado a lo largo de este capítulo, han de analizarse no sólo desde un punto de vista mecánico sino englobados en un conjunto de propiedades mecánicas, funcionales, de interacción con el hueso vivo y farmacológicas.

Los materiales estudiados tendrán en su aplicación un contacto íntimo con el hueso, y una función mecánica en conjunto con este. El hueso es un material compuesto de gran complejidad y posee una alta direccionalidad en su ordenación microestructural. Los cementos óseos han de cumplir la función de transmisión de cargas entre el hueso y la prótesis.

Los resultados de resistencia a tracción en los cementos son todos ellos menores que la resistencia a tracción del hueso. La resistencia del fémur humano en una persona de 20 a 39 años es

de $124 \pm 1,1$ MPa (Fung, 1993) valor superior al máximo obtenido en nuestro trabajo 52 ± 1 MPa garantizando así el fallo del cemento antes que el del hueso. Aunque hay que tener en cuenta que el hueso, que es sometido a cualquiera de las intervenciones quirúrgicas en las que se usan los cementos, ha disminuido sus propiedades respecto del hueso sano por cualquier causa degenerativa.

En cuanto al módulo elástico, ocurre lo mismo que en el caso de la resistencia a tracción, los cementos óseos poseen en cualquier caso módulos inferiores a los del fémur humano de 17,6 GPa.

Las propiedades estudiadas muestran en los casos de tracción y flexión en tres puntos, una mejora sustancial con la introducción de presión uniaxial en el proceso de polimerización. Por otro lado en el comportamiento en fractura la incidencia de la variable presión no es tan significativa, entrando las variaciones dentro del ámbito de la dispersión experimental.

Como se ha visto anteriormente, en el Capítulo 2, los cementos más interesantes desde el punto de vista farmacéutico, son los de base lactosa, siendo el ZL4G el más adecuado. Es la adición de este excipiente la que permite la liberación de mayores cantidades de antibiótico, pero es a la vez esta variación en la composición la que, como se ha descrito con anterioridad, disminuye sus propiedades mecánicas. Los comportamientos a tracción y flexión en tres puntos disminuyen frente al cemento sin excipientes, pero esta reducción de las propiedades mecánicas es prácticamente independiente de su concentración, se puede decir que la influencia del excipiente exhibe cierta saturación. Por otro lado hay que señalar que la lactosa como excipiente induce un aumento del comportamiento plástico en los cementos, que da lugar a un valor mayor para la energía de fractura.

Los cementos con hidroxipropilmetilcelulosa no mejoran la cesión de gentamicina y tampoco mejoran las propiedades mecánicas respecto al cemento polimerizado con presión uniaxial y antibiótico.

La introducción de los materiales en un reactor, para realizar los ensayos de cesión, dio como resultado la degradación de todas las propiedades mecánicas. Este comportamiento se debe a el cambio que provoca la cesión del antibiótico a través de los poros. El paso por el reactor produce una disminución de las tensiones últimas en tracción y flexión del 10 al 35%. En cuanto al comportamiento en fractura de los cementos tras su paso por el reactor, se puede decir que la tenacidad disminuye, es decir, la iniciación de los procesos de fractura es más fácil, ya que los materiales se han degradado ligeramente porque hay cesión del antibiótico. Por otro lado la energía de fractura aumenta cuando pasan los cementos por el reactor, esto es debido a que el comportamiento de los cementos es más plástico, ya que el paso por el reactor ha provocado un efecto plastificante como ya habían demostrado otros autores (Lewis, 1997).

A la vista de estos resultados, la selección del material óptimo para su uso en terapéutica, teniendo en cuenta el compromiso entre la mejora farmacológica con las prestaciones mecánicas, es el 20L4G P. Proporciona mayor cesión de antibiótico al medio para prevenir o tratar infecciones en los procesos quirúrgicos, y presenta unas propiedades mecánicas aceptables para su uso.

4.4. BIBLIOGRAFIA

1. Callister WD. Propiedades mecánicas de los metales. Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales. Barcelona: Reverté, 1995. p. 114-146.
2. Fried JR. Polymer science and technology. New Jersey: Prentice hall PTR, 1995.
3. Friis EA, Stromberg LJ, Cooke FW, McQueen DA. Fracture toughness of vacuum mixed PMMA bone cement. 19th Annu Mtg Soc Biomater. Birmingham, AL 1993:301.
4. Fung YC. Biomechanics. Mechanical properties of living tissues. New York: Springer-Verlag, 1993. p. 510-513.
5. Joschek S, Nies B, Krotz R, Göpferich A. Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. Biomaterials 2000;21:1645-1658.
6. Lewis G. Properties of acrylic bone cement: state of art review. J Biomed Mater Res 1997;38:155-182.
7. Mehta KA, Serpil M, Phuapradit W, Waseem A, Shah NH. Effect of formulation and process variables on porosity parameters and release rates from a multi unit erosion matrix of a poorly soluble drug. J Control Release 2000;63:201-211.
8. Munuera L. Biomecánica y biomateriales. Introducción a la traumatología y cirugía ortopédica. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana, 1996. p. 134-142.
9. Ortiz L. Tracción y compresión. Resistencia de materiales. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana, 1990. p. 3-7.
10. Salazar A, Pastor JY, Llorca J, Natividad E, Gimeno FJ, Angurel LA. Effect of thermal cycling on the strength and superconducting properties of laser floating zone textured Bi-2212 rods. Physica C 2003;384:443-450.
11. Scheurs DW, Spierings PTJ, Huiskes R, Sloof TJJH. Effect of preparation techniques on the porosity of acrylic cements. Acta Ortho Scand 1988;59:403-409.
12. Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L, Pierotti RA, Rouquérol J, Siemieniewska, T. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. International union of pure and applied chemistry. Pure and Appl Chem 1985;57:603-619.

13. Standard Test Method for Splitting Tensile Strength of Cylindrical Concrete Specimens, C496-90. Annual Book of ASTM Standards, vol. 04.02, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 1991.
14. Topoleski LDT, Ducheyne P, Cuckler JM. Microstructural pathway of fracture in poly (methyl methacrylate) bone cement. *Biomaterials* 1993;14:1165-1172.
15. Wixson RL, Lautenshalger EP, Novak MA. Vacuum mixing of acrylic bone cement. *J Arthroplasty* 1987;2:141-147.

5. CITOTOXICIDAD DEL MONÓMERO RESIDUAL EN LA POLIMERIZACIÓN DE CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS

5.1. INTRODUCCIÓN

Los cementos óseos acrílicos, desde su aparición en el año 1951 y su masiva introducción en la práctica quirúrgica reconstructiva en el 1968, ocupan hasta la fecha el primer lugar entre las técnicas de fijación de endoprótesis a la estructura ósea en artroplastias de cadera, de rodilla y en la sustitución y reconstrucción de otras articulaciones por lo que resulta imprescindible evaluar el riesgo toxicológico que pueden presentar los mismos una vez implantados en el tejido óseo (Morejón, 1999).

5.1.1. SENSIBILIZACIÓN E IRRITACIÓN

En los estudios de irritación y sensibilización producida por los cementos óseos se ha puesto especial énfasis en la evaluación de los componentes líquidos (en concreto de metacrilato de metilo), ya que los componentes sólidos de este material, compuestos fundamentalmente, por polímeros o copolímeros acrílicos, se consideran inertes e inocuos para el organismo humano.

Los estudios de su toxicidad se han realizado en dos direcciones:

- Evaluación de los daños que provocan los vapores del metacrilato de metilo (MMA) (en pacientes y personal médico).
- Evaluación de reacciones adversas producidas por contacto directo del monómero con el sistema biológico.

En cuanto al primer aspecto, está bien establecido que el MMA, al ser un compuesto orgánico altamente volátil y con un olor penetrante (se percibe en concentraciones de 0,2-0,3 ppm), puede provocar dolores de cabeza, cansancio, irritabilidad y pérdida de apetito, así como producir efectos irritantes en las membranas mucosas de ojos o del tracto respiratorio. En situaciones extremas este monómero provoca también otros síntomas, tales como dolores de extremidades, pérdida de memoria, trastornos del sueño (Innes y Tansey, 1981), que indican alteraciones del sistema nervioso central. Este efecto ha sido confirmado en estudios preclínicos en ratas (Darre y col; 1992).

Ha sido también comprobado, que concentraciones de 15.000 ppm del MMA en el ambiente son letales para estos animales después de 8 horas de exposición. Sin embargo, a concentraciones muy bajas (2,7 ppm), el vapor de este monómero sólo produce daños bajo

exposición continua (Tansy y col; 1976), se observa la ausencia de grasa subcutánea abdominal y afecciones intestinales.

El estudio a largo plazo (102 semanas) de inhalación en ratas y ratones mostró la presencia de las siguientes lesiones, inflamación, hiperplasia e inclusiones citoplasmáticas del epitelio respiratorio (Tansy y col; 1976).

Durante observaciones sistemáticas del personal expuesto a los vapores del MMA (médicos y enfermeras que trabajan con los cementos, operarios de la industria de plásticos, etc.) se han detectado otros efectos tóxicos de este monómero. Por ejemplo, se observa que sus vapores pueden causar la formación de úlceras de córnea y también influir sobre las glándulas que producen hormonas sexuales (efectos antigonadotrópicos), provocando desórdenes sexuales tanto en el personal masculino como femenino. Otros efectos sistémicos observados en el personal médico, como hipertensión, disnea y eritroderma son, afortunadamente, de corta duración y se eliminan con rapidez y sin complicaciones.

Para minimizar estos efectos, producidos por los vapores del MMA, se recomienda mantener un buen sistema de extracción de gases en los locales donde se trabaja con este monómero.

En el estudio de las reacciones tóxicas provocadas por el contacto directo de la parte líquida y del cemento fraguado con los tejidos vivos se han detectado afecciones vasculares que dependen fundamentalmente del tipo de tejido. Por ejemplo, en los ensayos de implantación ósea se observaron marcados efectos tóxicos sobre los tejidos adiposos, mientras que las afecciones de los tejidos óseo y fibroso fueron insignificantes. Esto refleja la afinidad del monómero hacia los tejidos ricos en lípidos.

En los estudios preclínicos se detectó que el peróxido de benzoilo puede inducir hiperplasia de la epidermis en ratones (Amblard y col; 1981). También se ha observado en algunos pacientes, manifestaciones de hipersensibilidad al MMA y a la DMPT (N, N'-dimetil-*p*-toluidina), pero se indica que estas reacciones son poco frecuentes (Haddad y col; 1996).

Por otra parte, se han detectado casos de dermatitis por contacto en los cirujanos ortopédicos y en los odontólogos que manipulan el cemento y el MMA, aún cuando en su manipulación empleasen guantes de goma. El rasgo distintivo de esta dermatitis consiste en la aparición de parestesia (irritación local) y sensibilidad (irritación sistémica), que permanece incluso después de eliminarse la erupción debido, posiblemente, a la acción del MMA sobre los nervios periféricos. Para prevenir estos efectos se recomienda el uso de guantes específicamente

impermeables al MMA; por ejemplo, de caucho butílico de 0,48 mm de grosor o de doble guante (Pegum y Medhurst, 1971) (Darre y col; 1987).

5.1.2. CITOTOXICIDAD

En la evaluación citotóxica de los cementos óseos se ensayan tanto los componentes por separado como el material fraguado. Por ejemplo, se detectó la acción citotóxica del MMA y de la parte líquida del cemento sobre cultivos de tejidos (Linder, 1976). En este último caso la respuesta fue más acentuada, lo que indica que otros integrantes de la parte líquida (DMPT e Hidroquinona) poseen propiedades citotóxicas.

A los componentes de la parte sólida del cemento también se les ha detectado algunas características citotóxicas. El peróxido de benzoilo en concentraciones elevadas modifica la morfología de las células traqueobronquiales e inhibe el intercambio Na-K, por lo que puede ser irritante, por ejemplo, frente a los tejidos de la pulpa dental. Sin embargo, su acción citotóxica sobre las bacterias le confiere propiedades bactericidas, aspecto favorable para la prevención de las posibles infecciones en el momento de la aplicación del cemento (Reynolds, 1989).

Aunque el polímero metacrílico como tal no se le asocian propiedades citotóxicas, sin embargo, los fragmentos del mismo, originados por la fricción y desgaste (fundamentalmente por el micromovimiento de los implantes) pueden ser potencialmente citotóxicos. En dependencia del tamaño, éstos pueden ser ingeridos por las células, promoviendo su muerte. De hecho, a las partículas del PMMA (específicamente pequeñas) se les han comprobado características citotóxicas: al incubar células tumorales Erlich Ascites con polvo del cemento acrílico se detectó una inhibición del crecimiento celular, disminución de la síntesis del ADN e inhibición del metabolismo glicolítico (Schachtschabel y Blenke, 1976). Sin embargo, estos efectos no se han detectado en cultivos de fibroblastos humanos.

En otros estudios se ha observado una cierta acción citotóxica del polvo del PMMA sobre las células macrófagas murinas detectando la inhibición de la síntesis de ADN y la subsiguiente muerte celular (Horowitz y col; 1986) (Davis y col; 1993).

A los extractos de los cementos también se les ha comprobado actividad citotóxica encontrando que éstos influyen sobre la proliferación de las células osteoblásticas MG-63 después de 72 horas de contacto (Granchi y col; 1995). Estos extractos de cementos óseos se obtienen siguiendo las normas ISO 10993 para ensayos biológicos y utilizando como medio de extracción el AIM-V. El efecto citotóxico de estos extractos, preparados a partir de 5 cementos comerciales y a diferentes intervalos de tiempo después de su fraguado (15 min, 60 min, 6 h, 24 h y 48 h), fue

inversamente proporcional al tiempo transcurrido entre la polimerización del cemento y la preparación del extracto (Granchi y col; 1995).

5.1.3. TERATOGENICIDAD Y TOXICIDAD FETAL

Para evaluar la seguridad de los cementos óseos en este sentido es necesario determinar, ante todo su toxicidad fetal y la teratogenicidad, incluyendo los efectos debidos a los vapores de sus componentes, sobre el personal médico que está en contacto con éstos, ya que si bien se puede evitar la colocación de los implantes acrílicos a mujeres embarazadas, resulta imprescindible evaluar las posibles complicaciones maternas o fetales que puede causar este producto en las mujeres embarazadas que trabajan en los quirófanos.

Para la evaluación de este tipo de toxicidad de los vapores de ésteres metacrílicos, se han llevado a cabo estudios, principalmente, en ratas y ratones debido a que precisamente estos roedores comparten las mismas reacciones teratogénicas que los humanos siendo más susceptibles a estos efectos que otras especies (Golstein y col; 1974) (Tuchmann-Duplessis, 1972).

Se ha demostrado que los ésteres acrílicos producen leves alteraciones teratogénicas en ratas (un ligero aumento del peso promedio de los fetos) y que la intensidad de estos efectos depende de la dosis empleada y de la vía de administración (Singh y col; 1972). Teniendo en cuenta que las dosis del MMA usadas en estos estudios eran muy superiores a las que se alcanzan en los quirófanos, por ejemplo, durante la artroplastia total de la cadera, y que la vía de su administración era intraperitoneal, este monómero se considera prácticamente no teratogénico para los seres humanos.

5.1.4. HEMOCOMPATIBILIDAD

En el caso de los cementos óseos existe una metodología estandarizada por las normas regulatorias internacionales, ISO 10993, para la ejecución de la prueba de hemocompatibilidad que consisten en un ensayo *in vitro* del material fraguado puesto en contacto con sangre de conejo. Estos ensayos, realizados según la metodología establecida, confirmaron la ausencia de actividad hemolítica del material fraguado, por lo que este producto se considera hemocompatible (Morejón, 1999).

A esta conclusión contribuyen los resultados obtenidos en los estudios *in vivo* mediante el siguiente procedimiento; se analizaron muestras de sangre extraída a los pacientes durante la colocación de las prótesis cementadas de cadera y de rodilla, cuantificándose la concentración de monómero y de trombina en la sangre, con el fin de establecer alguna dependencia entre estos dos parámetros. Los resultados obtenidos indican que la actividad coaguladora no está relacionada con

la introducción del cemento a la cavidad ósea, ya que la generación de trombina no depende de la aparición del MMA en sangre (Morejón, 1999).

5.1.5. GENOTOXICIDAD

En la evaluación genotóxica de los cementos óseos se utilizan:

- Ensayos *in vitro*: Test de Ames (evalúa la mutación genética).
- Ensayos *in vivo*: Test de micronúcleos (detecta la aberración numérica y estructural de cromosomas). Estos últimos se realizan mediante la inyección de los extractos de los cementos en los tejidos óseos de ratones (Morejón, 1994) o la introducción de los componentes líquidos de este material en ratones o ratas (Taningher y col; 1993).

Cabe mencionar que los resultados descritos en la literatura sobre la actividad genotóxica de los cementos óseos son muy contradictorios, lo que se debe en gran medida, a la ausencia de metodologías estandarizadas para su ejecución.

Por esta razón, en dependencia del procedimiento empleado, el mismo material puede manifestar diferentes respuestas genotóxicas. Por ejemplo, el test de Ames realizado al cemento fraguado reveló incrementos aislados de mutaciones reversas en *Salmonella typhimurium*, mientras que el ensayo de micronúcleos no demostró la mutagenicidad de este material (Jensen y col; 1991). Sin embargo, al realizar el test de micronúcleos a extractos del cemento recién fraguado, se observó un incremento significativo de la frecuencia de micronúcleos en cultivos de linfocitos humanos, sugiriendo que en este caso la respuesta genotóxica se debe a la presencia de los componentes no fraguados (MMA, amina, hidroquinona). Esta suposición la corroboran los resultados de ensayos, tanto *in vitro* (test de micronúcleos en células de hámster V79) como *in vivo*, realizados con estos componentes orgánicos en ratas y ratones (Taningher y col; 1993). Se ha comprobado que la N, N'-dimetil-*p*-toluidina induce alteraciones cromosómicas y provoca leves daños al ADN.

Para poder obtener conclusiones definitivas sobre la actividad genotóxica de los cementos óseos se precisa, ante todo, independizar los resultados de los ensayos de la metodología empleada, estandarizando los procedimientos y teniendo en cuenta las condiciones reales que pueden crearse en el organismo al implantar este biomaterial. Con respecto a este último aspecto, parece más adecuado la evaluación de los extractos del cemento recién polimerizado, al mismo tiempo que, al realizar las pruebas *in vivo*, hay que tener en cuenta que la dosis suministrada debe reflejar la relación entre los pesos del implante y del paciente.

5.1.6. CARCINOGENICIDAD

En el caso de los cementos óseos se ensaya tanto el material fraguado como sus componentes por separado. Estudiando los efectos carcinogénicos de los implantes a largo plazo se llegó a la conclusión de que el cemento fraguado es prácticamente inocuo al cuerpo humano; en 28 años de su utilización se citan sólo 96 casos de cáncer inducido por los implantes, de ellos 25% después de 16 años y 50% entre 20 y 28 años después de la operación. Teniendo en cuenta la cantidad de portadores de prótesis cementadas (más de 12 millones), esta incidencia se considera baja.

Los componentes individuales de la parte sólida (PMMA, peróxido de benzoilo y sulfato de bario) se consideran histocompatibles, aunque en algunos estudios se han observado la presencia de leves efectos cancerígenos en ratones y ratas, que no han sido detectados en los conejillos de Indias.

En cuanto al metacrilato de metilo se ha comprobado que los vapores de este monómero no producen efectos cancerígenos en ratones y ratas (Chan y col; 1988).

Se aconseja tener especial cuidado en la extrapolación de estos resultados a los seres humanos y se sugiere seguir observando la evolución clínica de los portadores de las prótesis cementadas, para poder así excluir definitivamente el riesgo de inducción de sarcoma de estímulo a largo plazo (50 años después de la aplicación masiva del material).

5.1.7. TOXICIDAD SISTÉMICA AGUDA

Los síntomas que se observan en los pacientes durante la colocación de los cementos indican la presencia de daños sistémicos que, en algunos casos, resultan ser agudos. Estos daños se asocian, fundamentalmente, con la aparición de componentes orgánicos de bajo peso molecular en la circulación sanguínea, que provocan la vasodilatación periférica y depresión directa del miocardio. Está ampliamente demostrado que la caída máxima de la presión sanguínea se produce a los tres minutos después de la colocación del cemento en el conducto femoral, lo que coincide con la máxima concentración del monómero en la sangre (Cambell, 1998). Esta hipotensión transitoria puede provocar serios efectos adversos, tales como paros cardiacos, accidentes cerebrovasculares, infartos de miocardio y embolias pulmonares (Newens y Volz, 1972) (Schuh y col; 1973). Afortunadamente, estos serios trastornos son muy poco frecuentes y se observan, generalmente, en pacientes de avanzada edad y delicado estado de salud. Para estimar con precisión los daños sistémicos de los cementos se realizan los ensayos preclínicos con todos y cada uno de sus componentes determinando la dosis máxima tolerable por el organismo vivo y los mecanismos que producen estos efectos.

Se ha observado, mediante estudios *in vitro*, que el MMA afecta la movilización intra e intercelular de calcio y altera el funcionamiento de los músculos vasculares. En los ensayos *in vivo* en ratas, ratones, perros y caballos se determinó la dosis letal del monómero, que depende del tipo de especie y de la vía de administración, oscilando entre 1.000 mg/kg hasta 7.500 mg/kg. Adicionalmente, se ha detectado que la causa principal de la muerte de los animales era de índole respiratorio. Estos estudios han permitido estimar la dosis letal del MMA en el hombre, que resultó ser 1.872 mg/kg, cuando se administra por vía intraperitoneal, y 5.616 mg/kg, al introducirlo por vía subcutánea.

Para el peróxido de benzoilo, la dosis letal en ratones es de 700 ppm cuando esta sustancia se administra por inhalación y puede ser tolerable hasta 25 g/kg en el contacto directo con la piel. Para el hombre, la dosis letal de este producto se estima de 500 mg/kg cuando se administra por vía oral (Turek, 1982). En el caso de la N, N'-dimetil-*p*-toluidina la dosis letal en ratas por administración oral es de 550 mg/kg y la tolerancia media en ratones es de 212 mg/kg.

Para evitar los fracasos en el uso de cementos óseos acrílicos es necesario tener en cuenta todos sus efectos adversos. En este sentido, un profundo conocimiento de las reacciones sistémicas agudas que éstos pueden producir en el momento de la intervención quirúrgica se convierte en un requisito indispensable para lograr el éxito en las operaciones. Estos conocimientos proporcionan también la base para una adecuada selección de los pacientes sugiriéndose evitar la utilización de esta técnica en personas que padecen de arterioesclerosis, hipertensión o enfermedades cardíacas y cuyo organismo no está preparado para compensar los repentinos cambios fisiológicos que pueden producirse en el momento de la operación.

5.1.8. ESTUDIOS DE IMPLANTACIÓN

Los estudios de implantación están destinados a determinar los efectos locales que puede provocar el cemento una vez colocado en el cuerpo humano.

Los efectos locales adversos causados a los tejidos adyacentes se relacionan, fundamentalmente, con tres aspectos a tener en cuenta:

- Efecto exotérmico de la polimerización
- Oclusión de las arterias metafisiarias nutricias con la consiguiente aparición en el área de necrosis ósea
- Acción lipolítica y citotóxica del monómero residual

Con respecto al primer aspecto se puede mencionar que, en el momento del fraguado del cemento, su temperatura puede alcanzar los 100 °C, lo que causaría la coagulación de las proteínas.

Sin embargo, bajo condiciones reales, cuando se coloca una fina capa de cemento entorno a la prótesis, la temperatura de la interfase hueso-cemento no supera los 70 °C (Morejón, 1999).

Las observaciones sistemáticas de los síntomas provocados por los implantes acrílicos permitieron generalizar las alteraciones histológicas, que pueden surgir durante las operaciones de artroplastia total de cadera, así como cronometrar la recuperación de los tejidos en el sitio del implante. A continuación se presenta un cuadro general de ambos efectos (Cambell, 1981):

1. Los tejidos permanecen lesionados hasta 3 semanas. Se necrosa una capa de tejido blando y fibrina de hasta 3 mm de espesor y lo mismo sucede con los focos más grandes de hueso esponjoso del trocánter mayor y del conducto femoral por debajo de la punta del tallo.
2. En la tercera semana se inicia un período de recuperación que dura hasta los dos años. El lecho del implante se reorganiza y esto se caracteriza por invasión de tejido fibroso y capilares, que sustituyen al hueso necrosado.
3. A los dos años el lecho del implante suele estar bien establecido: es una membrana fina de tejido conectivo de 0,5 a 1,5 mm de grosor. Se observan fragmentos esféricos del polímero rodeados por una respuesta de células gigantes, y el tejido lesionado del conducto medular suele estar reemplazado por tejido normal.

La presencia del monómero y otros componentes orgánicos puede provocar traumas químicos y la exotermicidad del proceso de polimerización (fraguado) puede causar traumas térmicos. A la necrosis inicial le sigue una restauración del tejido, lo que se manifiesta en la aparición de granulación y de una membrana fibrosa. Finalmente, se logra una estabilización de la prótesis debido a la formación de un tejido blando, principalmente fibroso.

El conocimiento de estos fenómenos es necesario, tanto para la optimización de las técnicas de implantación, con el objetivo de minimizar los traumas intraoperatorios, como para una correcta prescripción de la conducta postoperatoria de los pacientes, que favorezca una buena fijación de la prótesis a la estructura ósea a largo plazo.

Por todo lo visto anteriormente uno de los objetivos primordiales de este trabajo es la determinación de la cantidad de monómero residual que queda en el cemento después de la polimerización, en el momento en que se inserta en el organismo. Para esta determinación se usó Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN-¹H). Otros autores han detectado y cuantificado el monómero residual mediante HPLC (Vallittu y col., 1995), (Bettencourt y col., 2001), (Bettencourt y col., 2000).

5.1.9. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN (RMN-¹H).

La resonancia magnética nuclear es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y, en su aplicación más común, en las propiedades del núcleo de hidrógeno.

El método de RMN es relativamente moderno (en comparación a otras espectroscopias) pues data de 1946, año en el que Purcell de la Universidad de Harvard y Bloch y Packard de la Universidad de Stanford obtuvieron los primeros resultados.

Un espectrómetro de RMN consiste esencialmente en un imán, un emisor de radiofrecuencia y un detector de radiofrecuencia (Fig. 1).

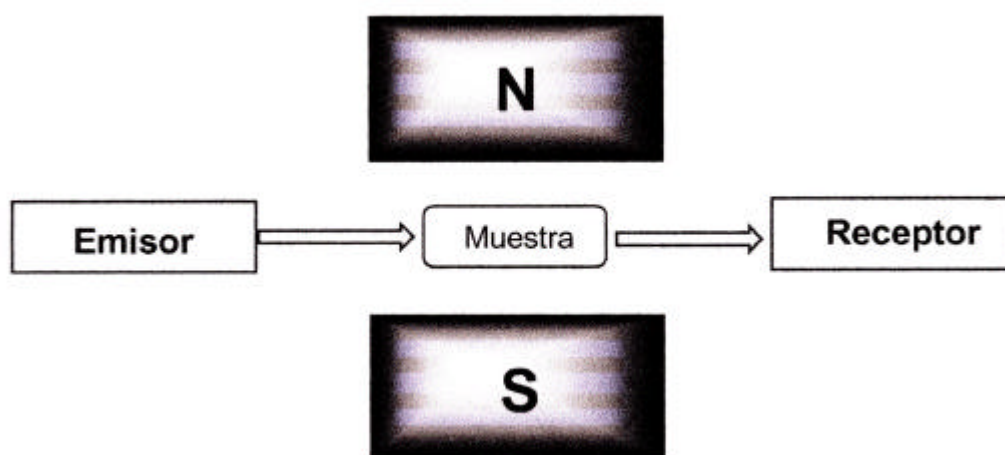


Figura 1. Esquema del espectrómetro de RMN.

Los núcleos de los átomos, al igual que los electrones, poseen un momento magnético asociado a un momento angular de spin, que puede interpretarse como una consecuencia de la rotación alrededor de su eje. Esta rotación, en ausencia de un campo magnético externo, puede realizarse libremente, sin restricción alguna respecto de su orientación; ahora bien, en presencia de un campo magnético, la orientación que puede adoptar el eje de rotación está cuantizada, no pudiendo tomar más que determinados valores.

Cada una de las orientaciones que puede adquirir el núcleo de un átomo en su movimiento de spin, en presencia de un campo magnético, pertenece a un nivel de energía, por ello, podrán observarse tránsitos entre niveles de spin permitidos, si se hace interaccionar el núcleo en cuestión con una radiación electromagnética cuya frecuencia corresponde a una energía exactamente igual que la existente entre los niveles que toman parte en el tránsito. Es en este caso cuando podrá observarse absorción de energía radiante, y por lo tanto un espectro de absorción.

Desde el punto de vista clásico, la aplicación de un campo magnético a un dipolo magnético produce en éste un movimiento de precesión; pues bien, en el caso de un núcleo atómico, cuando la frecuencia de este movimiento precesional es igual a la frecuencia de la radiación electromagnética, el sistema se encuentra en resonancia, y es cuando puede ser absorbida la energía necesaria para realizar el tránsito. Se habla entonces de espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), para referirse a tales transiciones.

En la Tabla 1 se pueden ver las propiedades magnéticas de algunos núcleos.

Tabla 1. Propiedades de algunos núcleos.

NÚCLEO	ABUNDANCIA	I (spin nuclear)	g_N (factor nuclear)
Neutrón	—	1/2	-3,8263
¹ H	99,985	1/2	5,5856
² H	0,015	1	0,8574
¹² C	98,892	0	—
¹³ C	1,108	1/2	1,4048
¹⁴ N	99,635	1	0,4066
¹⁵ N	0,365	1/2	-0,566
¹⁶ O	99,76	0	—
¹⁹ F	100	1/2	5,257
²³ Na	100	3/2	1,478
³¹ P	100	1/2	2,263
³² S	95,0	0	—
³⁵ Cl	75,5	3/2	0,5479
⁷⁹ Br	50,6	3/2	1,404
¹²⁷ I	100	5/2	1,124

Los núcleos con spin nuclear, $I = 0$, no tienen momento magnético y consecuentemente no producirán absorción RMN. Ejemplos de tales núcleos los constituyen ¹²C, ¹⁶O y ³²S. Los núcleos con $I \geq 1$, tienen, además de momento magnético, momentos electrónicos cuadrupolares, que ensanchan las bandas de absorción y hacen poco útil el espectro al eliminar la estructura fina, cuyo significado químico es importante. La mayor parte de los estudios de RMN se realizan con núcleos de $I = 1/2$, de los cuales el más frecuentemente utilizado es el protón (Valls y del Castillo, 1998).

Como se ha mencionado anteriormente el objetivo de este trabajo es determinar cuantitativamente el monómero residual contenido en los cementos en el momento de implantarse en el organismo y además estudiar mediante líneas celulares de macrófagos, la citotoxicidad de este monómero residual. Es muy frecuente el estudio de la citotoxicidad de este monómero en distintas líneas celulares (Taira y col., 2000), (Cimpan y col., 2000), (Martins y col., 1997).

5.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.2.1. MATERIALES

Para el estudio de la determinación del monómero residual y de la citotoxicidad se emplearon muestras de cementos con distinta composición de moduladores de la cesión y antibiótico y se prepararon como se describió en el capítulo 2.

El cloroformo deuterado se utilizó para la determinación por RMN-¹H del monómero residual que queda en los cementos. Este reactivo se obtuvo de los laboratorios SDS (Barcelona, España).

Para las pruebas de citotoxicidad se emplearon macrófagos murinos de la línea J774.

5.2.2. DETERMINACIÓN DEL MONÓMERO RESIDUAL

Se determinó la cantidad de monómero residual presente en los cementos, en el momento en que se implantan en el organismo (5 minutos después de la polimerización) y en el momento en que se produce el endurecimiento del cemento (10 minutos después de la polimerización). Para esta determinación se utilizó la técnica de RMN-¹H, los espectros se registraron en un espectrómetro Briker AC-250, que opera a 250 MHz para ¹H.

Se tomaron por duplicado pequeñas muestras de los cementos y se colocaron en un tubo de ensayo con 2 ml de cloroformo deuterado. Una vez disueltas las muestras, se registraron los espectros de RMN junto con las integrales de las regiones vinilo (δ 5,50-6,20) y metoxilo (δ 3,38-3,87). El porcentaje de monómero presente en la muestra se calculó de la siguiente manera (Sheinin y col., 1976):

$$\% \text{ monómero} = \frac{1,5 \times A_V}{A_M} \times 100$$

Donde, A_M : media de dos determinaciones de la integral de metoxilo.

A_V : media de dos determinaciones de la integral de vinilo.

1,5: factor de conversión que relaciona el nº de protones en la región vinil (2) con el grupo metoxilo (3).

5.2.3. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

Estos estudios se realizaron en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la UCM.

En estas pruebas se emplean macrófagos murinos de la línea J774. Su cultivo en monocapa se mantiene de una forma indefinida, mediante pases sucesivos, en frascos de cultivo celular de 25 cm², a 37 °C con 5% de CO₂. El medio empleado para el crecimiento es el RPMI-1640 suplementado con 10% SBF y antibióticos. La conservación de la línea se realiza por criopreservación.

Para la realización de este estudio, se procede inicialmente, despegando y separando las células con una solución de EDTA en PBS 1 g/l, tras 5-10 min. de incubación en la estufa a 37 °C. El EDTA actúa como capturador de iones Ca²⁺, necesarios para la adhesión de las células a la botella. Estos se recogen y se les retira la solución de EDTA mediante centrifugación (1100 g., 5 min.). Se resuspenden en medio fresco, se determina la concentración y viabilidad con una solución de azul de tripán y mediante recuento en cámara de Neubauer. Por último, la concentración se ajusta dependiendo de la técnica o proceso para el que vayan a ser utilizados.

Para las pruebas de citotoxicidad se siembran en placas de 96 pocillos, 70.000 macrófagos por pocillo, en 100 µl de medio. Tras 24 h. de incubación a 37 °C y 5% de CO₂, se retira el medio y se añade 200 µl de medio fresco con el MMA previamente disuelto a las concentraciones a ensayar, utilizando 3 pocillos por concentración. Por cada concentración se dejó un pocillo sin células, pero con medio y MMA, que sirve como blanco del fármaco. A 6 pocillos control solo se les añadió medio de cultivo. Además se utilizan 3 pocillos con medio, y sin células que sirven como blanco del control. Tras 24 h de incubación con MMA a distintas concentraciones, se procede a la evaluación de la citotoxicidad.

Para la evaluación de la citotoxicidad se emplea un método propuesto por Hattori y Nakanishi (Hattori y Nakanishi, 1995). Se mide la respiración celular, como indicador de la viabilidad celular, con un método basado en la reducción a nivel mitocondrial de MTT. Tras 24 h. en contacto con el monómero, se retira el medio y se añade 100 µl de una solución de MTT 0,4 mg/ml, se incuban las células durante 60 min. a 37 °C. Los cristales de formazán, se disuelven con 100 µl de DMSO y luego se leen las absorbancias a 595 nm. Aquellos productos de elevada toxicidad darán lecturas de absorbancias bajas, mientras que los no tóxicos, tendrán un color similar a los controles. Para calcular la citotoxicidad se emplea la siguiente fórmula:

$$\%C = 100 - \left[\frac{A_{\text{fármaco}} - A_{\text{blanco fármaco}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} \right] \times 100$$

donde %C es el porcentaje de citotoxicidad frente a macrófagos; $A_{\text{fármaco}} - A_{\text{blanco fármaco}}$ es la absorbancia media de los pocillos del MMA a una concentración determinada, menos la absorbancia de su blanco; y $(A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}})$ es la absorbancia media de los pocillos control, menos la absorbancia media de los blancos control (Muelas y col., 2001).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 DETERMINACIÓN DEL MONÓMERO RESIDUAL

En la Fig. 2 se presenta el espectro del componente en polvo del cemento comercial CMW1® Radiopaco. Las integrales (δ 8,00-7,10) corresponden al peróxido de benzoilo y el resto de señales al PMMA prepolimerizado.

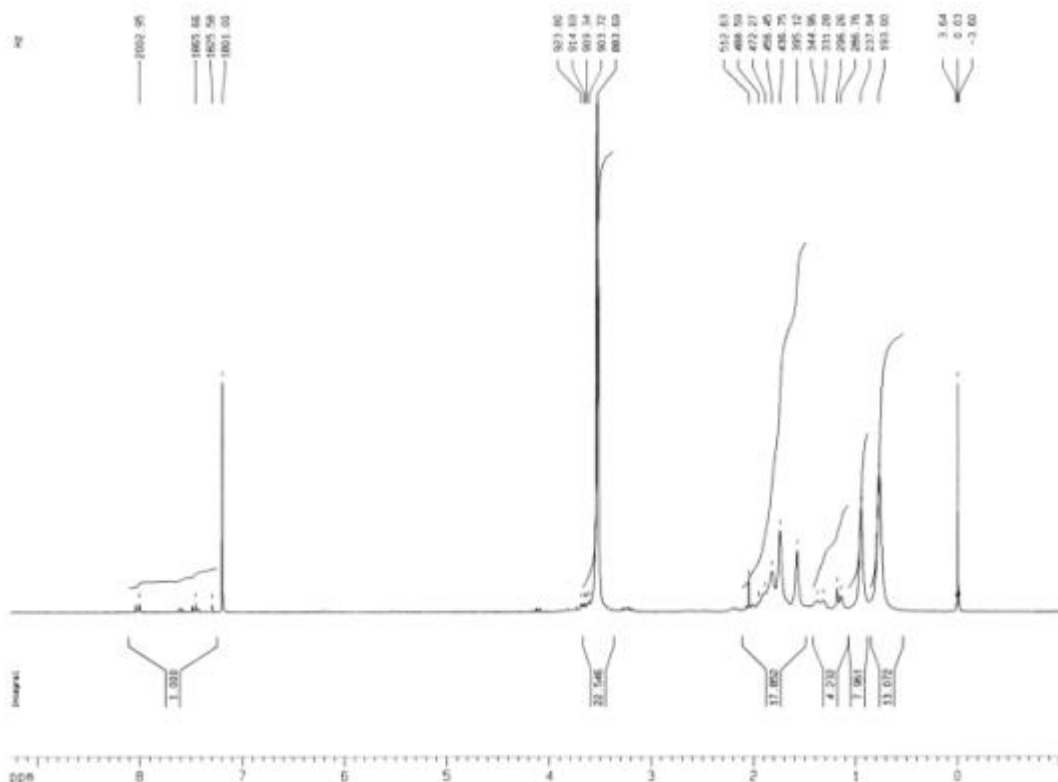


Figura 2. Espectro de $RMN-^1H$ del componente en polvo del cemento comercial CMW1® Radiopaco.

En la Fig. 3 se observa el espectro del componente líquido del cemento comercial CMW1[®] Radiopaco. La N, N'-dimetil-*p*-toluidina y la hidroquinona no se detectan por esta técnica de análisis. Así que todas las señales corresponden al MMA. Las señales importantes para determinar el porcentaje de monómero residual, como ya se ha indicado antes, son las integrales de las regiones vinilo (δ 5,50-6,20) y metoxilo (δ 3,38-3,87). La otra señal (δ 1,90) corresponde al grupo metil del MMA.

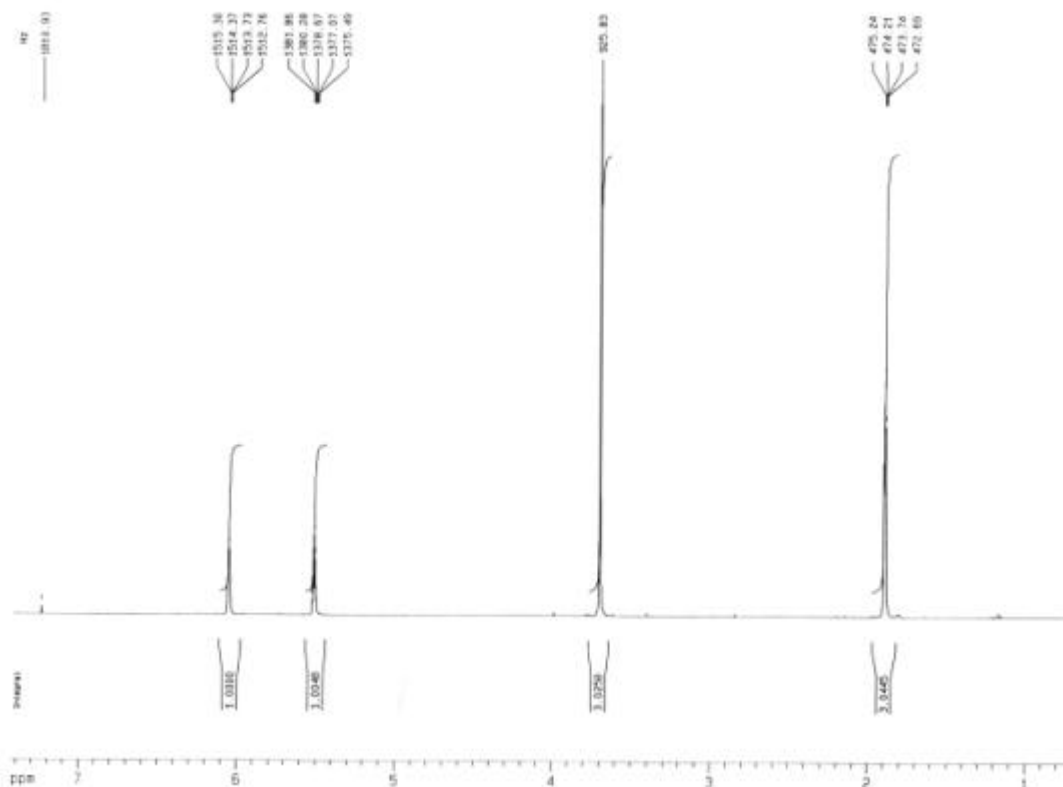


Figura 3. Espectro de RMN-¹H del componente líquido del cemento comercial CMW1[®] Radiopaco.

En las Figs. 4 y 5 se presentan los espectros del cemento comercial CMW1[®] Radiopaco, a los 5 min. de la polimerización (momento en que el cemento se inserta en el organismo) y a los 10 min. de la polimerización (cuando se produce el endurecimiento del mismo) respectivamente. Se puede observar como los valores de las integrales vinilo (8,137) y metoxilo (60,143) a los 5 min. son mayores que los valores de estas integrales a los 10 min. (4,71), (31,305). Esto indica que el monómero continua reaccionando, habiendo menor cantidad de monómero después de 10 min. de que se haya producido la polimerización.

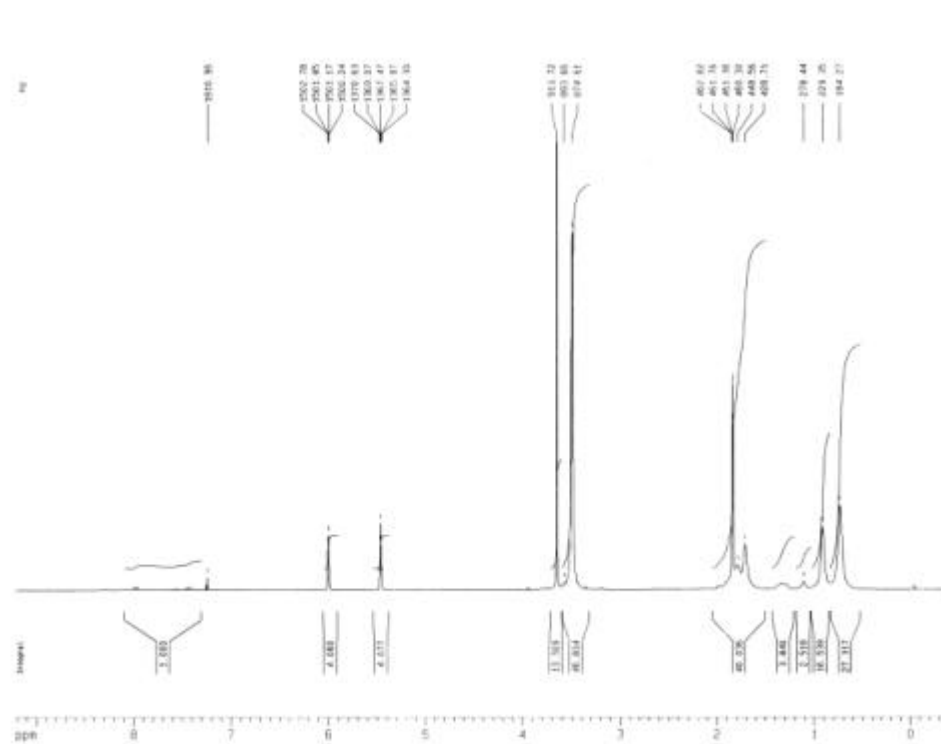


Figura 4. Espectro de RMN-¹H del cemento comercial CMW1⁰ Radiopaco a los 5 min. de la polimerización.

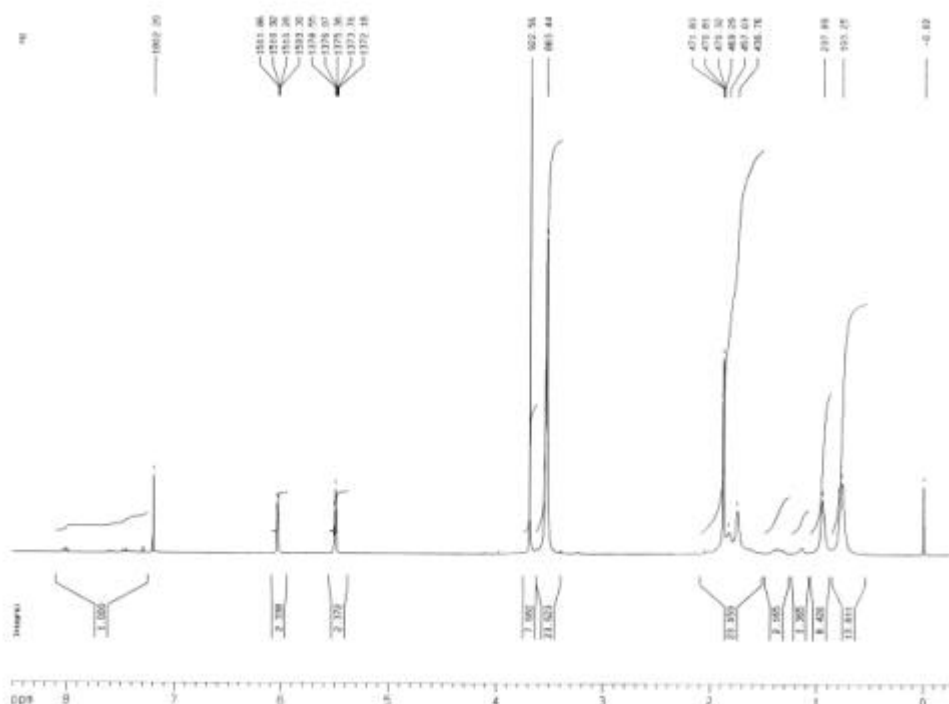


Figura 5. Espectro de RMN-¹H del cemento comercial CMW1⁰ Radiopaco a los 10 min. de la polimerización.

En las Tablas 2 y 3 se muestran los resultados de monómero residual obtenidos para todas las formulaciones a los 5 y 10 min. de la polimerización respectivamente. Los cementos comerciales presentan alrededor de un 22% de monómero residual a los 5 minutos. El porcentaje de monómero en los cementos modificados a este mismo tiempo osciló entre un 23 y un 29%. Las muestras de los cementos comerciales tomadas a los 10 minutos presentaron un 18% de monómero residual, mientras que este porcentaje fue entre un 17-25% en los cementos modificados. El valor de monómero residual obtenido para los cementos comerciales coincide con los valores obtenidos por otros autores (Sheinin y col., 1976).

Los cementos modificados presentan mayor porcentaje de monómero residual que los cementos comerciales tanto a los 5 como a los 10 min. de iniciada la polimerización del cemento. Este hecho puede deberse a que los moduladores de la cesión introducidos en estos cementos modificados dificultan la polimerización, por lo tanto habrá más monómero que no ha reaccionado dando lugar a un mayor porcentaje de monómero residual.

Una vez determinada la cantidad de monómero residual presente en los cementos, el paso siguiente será realizar estudios de citotoxicidad en macrófagos para ver si esta cantidad de monómero puede producir daño celular.

Tabla 2. Porcentaje de monómero residual de las formulaciones estudiadas a los 5 minutos de la polimerización. Valor medio \pm desviación estándar.

MUESTRA	COMPOSICION	% MONÓMERO
Componente líquido del CMW1 [®] Radiopaco	—	99,22 \pm 0,23
CMW1 [®] RC	CMW1 [®] Radiopaco (cemento)	22,75 \pm 0,35
CMW1 [®] GC	CMW1 [®] Gentamicina (cemento)	22,32 \pm 0,57
Formulación 10L4G	10% lactosa, 4% gentamicina	24,70 \pm 0,16
Formulación 10L8G	10% lactosa, 8% gentamicina	26,61 \pm 0,12
Formulación 15L6G	15% lactosa, 6% gentamicina	25,07 \pm 0,19
Formulación 20L4G	20% lactosa, 4% gentamicina	27,15 \pm 0,12
Formulación 20L8G	20% lactosa, 8% gentamicina	28,38 \pm 0,18
Formulación 10H4G	10% HPMC, 4% gentamicina	23,23 \pm 0,13
Formulación 10H8G	10% HPMC, 8% gentamicina	23,98 \pm 0,10
Formulación 15H6G	15% HPMC, 6% gentamicina	23,02 \pm 0,17
Formulación 20H4G	20% HPMC, 4% gentamicina	22,76 \pm 0,19
Formulación 20H8G	20% HPMC, 8% gentamicina	29,18 \pm 0,32

Tabla 3. Porcentaje de monómero residual de las formulaciones estudiadas a los 10 minutos de la polimerización. Valor medio \pm desviación estándar.

MUESTRA	COMPOSICION	% MONÓMERO
CMW1 [®] RC	CMW1 [®] Radiopaco (cemento)	20,22 \pm 0,33
CMW1 [®] GC	CMW1 [®] Gentamicina (cemento)	16,80 \pm 0,20
Formulación 10L4G	10% lactosa, 4% gentamicina	20,17 \pm 0,37
Formulación 10L8G	10% lactosa, 8% gentamicina	22,92 \pm 0,12
Formulación 15L6G	15% lactosa, 6% gentamicina	21,53 \pm 0,13
Formulación 20L4G	20% lactosa, 4% gentamicina	24,00 \pm 0,39
Formulación 20L8G	20% lactosa, 8% gentamicina	23,32 \pm 0,14
Formulación 10H4G	10% HPMC, 4% gentamicina	20,11 \pm 0,18
Formulación 10H8G	10% HPMC, 8% gentamicina	19,69 \pm 0,12
Formulación 15H6G	15% HPMC, 6% gentamicina	17,53 \pm 0,15
Formulación 20H4G	20% HPMC, 4% gentamicina	21,61 \pm 0,27
Formulación 20H8G	20% HPMC, 8% gentamicina	25,53 \pm 0,14

5.3.2. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

Un ejemplo de cómo son las placas utilizadas en este tipo de estudios se puede observar en la Fig. 6.

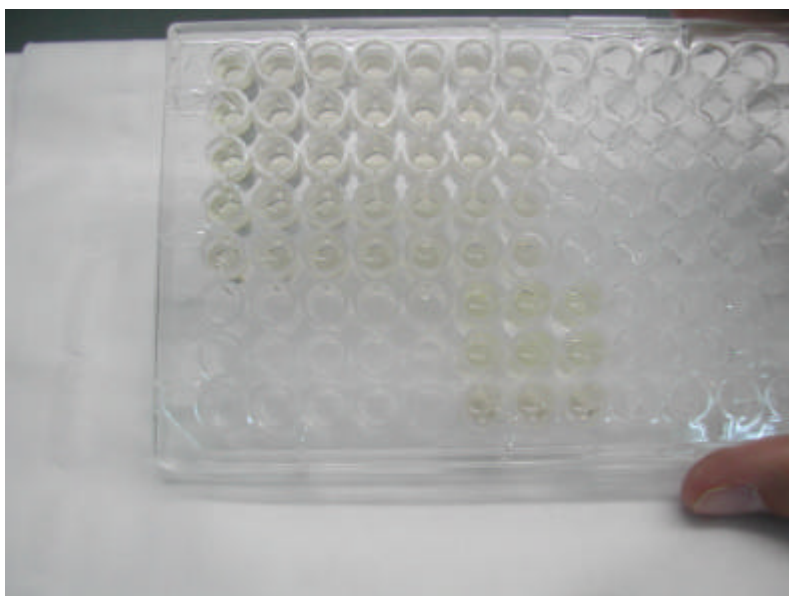


Figura 6. Placa de 96 pocillos utilizada en los estudios de citotoxicidad de macrófagos.

En la Fig. 7 se representa el aspecto de los macrófagos vistos al microscopio invertido sin monómero y con diferentes concentraciones de monómero. Se puede ver como a medida que se añade el MMA se pierde la morfología de los macrófagos indicando la citotoxicidad del MMA sobre los macrófagos. En la Fig. 7d se observa una capa que forma el MMA al estar en una concentración muy alta y en la cual prácticamente no hay macrófagos debido a la citotoxicidad tan alta que tiene esta concentración.

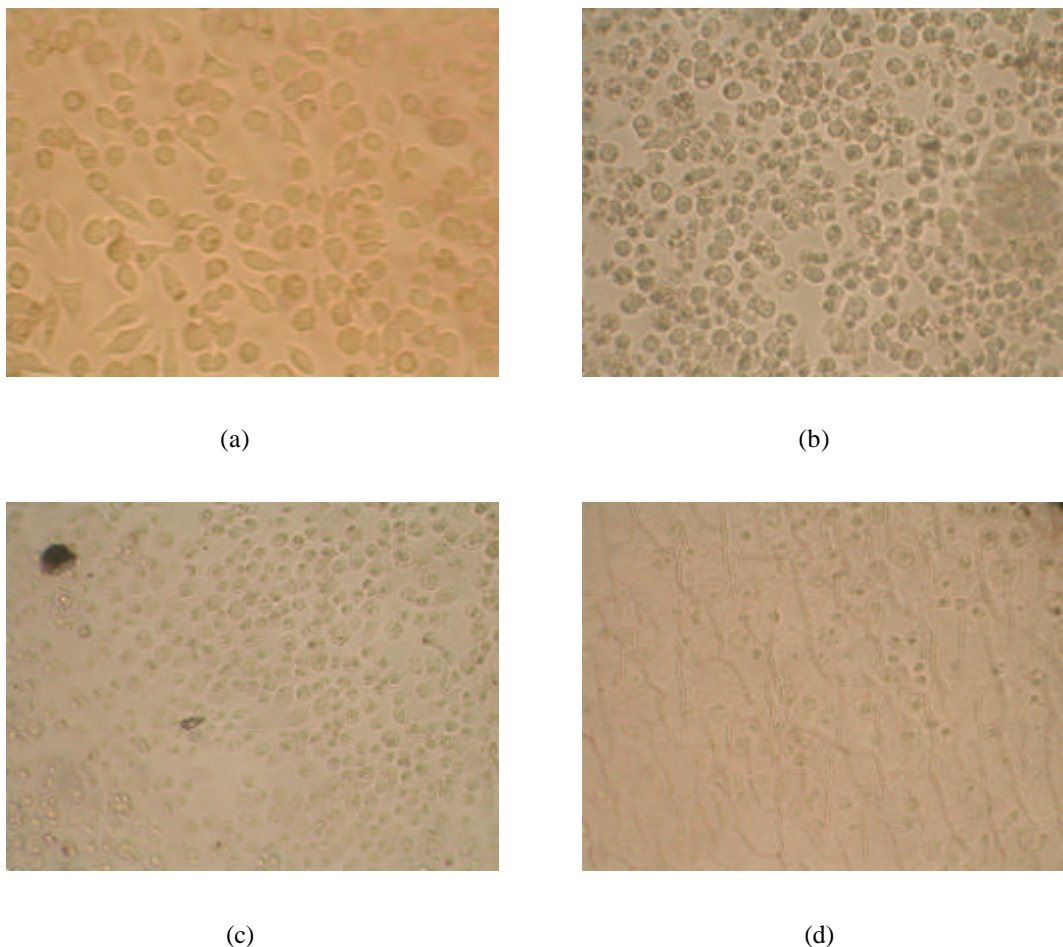


Figura 7. Fotografías de macrófagos (a) sin MMA, (b) con 7 mg/ml de MMA, (c) con 9 mg/ml de MMA y (d) con 29 mg/ml de MMA.

En la Tabla 4 se recogen todos los valores obtenidos del estudio de citotoxicidad del MMA. Se considera que el MMA es citotóxico cuando presenta un porcentaje de citotoxicidad de más del 50%. Por lo tanto, una concentración de 11 mg/ml ya se considera citotóxica. El porcentaje de monómero residual presente en cada una de las muestras a los 5 min. y a los 10 min. de la polimerización presentan una concentración mayor de 11 mg/ml, de modo que todos los cementos tanto comerciales como modificados son citotóxicos en macrófagos considerando que todo el monómero residual se cediera al medio celular. Por lo tanto en el siguiente capítulo se estudiarán otras alternativas terapéuticas a estos cementos para evitar la posible toxicidad que podrían producir en el organismo.

Tabla 4. Porcentaje de citotoxicidad a distintas concentraciones de MMA. Valor medio \pm desviación estándar.

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	% CITOTOXICIDAD
3	0 \pm 1,6
5	0 \pm 2,1
7	11,83 \pm 1,6
9	48,52 \pm 8,87
11	86,39 \pm 4,73
13	99,41 \pm 2,37
15	100 \pm 1,77
17	100 \pm 2,96
19	100 \pm 1,18
22	100 \pm 2,36
24	100 \pm 4,73
26	100 \pm 1,77
29	100 \pm 2,36
32	100 \pm 3,55
35	100 \pm 0,59

5.4. BIBLIOGRAFIA

1. Amblard P, Beani JC, Reymond JL, Guillot B, Gautron R. Phototoxic capacity of 10 percent benzoyl peroxide. *Ann Dermatol Venereol* 1981;108:389-395.
2. Bettencourt A, Calado A, Amaral J, Vale FM, Rico JMT, Monteiro J, Lopes A, Pereira L, Castro M. In vitro release studies of methylmethacrylate liberation from acrylic cement powder. *Int J Pharm* 2000;197:161-168.
3. Bettencourt A, Calado A, Amaral J, Vale FM, Rico JMT, Monteiro J, Castro M. The influence of vacuum mixing on methylmethacrylate liberation from acrylic cement powder. *Int J Pharm* 2001;219:89-93.
4. Cambell W. *Cirugía ortopédica vol III*. Madrid: Harcourt Brac, 1998. p. 2137.
5. Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, Matre R. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci* 2000;108:59-69.
6. Chan PC, Eustis SL, Huff JE, Haseman JK, Ragan H. Two-year inhalation carcinogenesis studies of methyl methacrylate in rats and mice: inflammation and degeneration of nasal epithelium. *Toxicology* 1988;52:237-243.
7. Darre E, Vedel P, Jensen JS. Skin protection against methyl methacrylate. *Acta Orthop Scand* 1987;58:236-247.

8. Darre E, Jorgensen LG, Vedel P, Jensen JS. Breathing zone concentrations of methyl methacrylate monomer during joint replacement operations. *Pharmacology & Toxicology* 1992;71:198-212.
9. Davis RS, Goodman SB, Smith RL, Lerman JA, Williams RJ. The effects of bone cement powder on human adherent monocytes/macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res* 1993;27:1039-1045.
10. Golstein A, Aronov L, Kalman SM. Chemical teratogenesis in principles of drug action. The basis of pharmacology. New York: Wiley, 1974.
11. Granchi D, Stea S, Ciapetti G, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoterrato A. In vitro effects of bone cements on the cell cycle of osteoblast – like cells. *Biomaterials* 1995;16:1187-1192.
12. Haddad FS, Cobb AS, Bentley G, Levell NJ, Down PM. Hypersensitivity in aseptic loosening of total hip replacements. The role of constituents of bone cement. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78:546-558.
13. Hattori Y, Nakanishi N. Effects of cyclosporin A and FK 506 on nitric oxide and tetrahydrobiopterin synthesis in bacterial lipopolysaccharide - treated J774 macrophages. *Cell Immunol* 1995;165:7-11.
14. Horowitz S, Frondoza C, Lennox DW. Effect of polymethylmethacrylate on a murine macrophage P388D1 line. In: Goldberg VM, editor. Transactions of the 32nd annual meeting of the orthopaedic research society. New Jersey: Orthopaedic research society, 1986.
15. Innes DL, Tansey MF. Central nervous system effects methyl methacrylate vapor. *Neurotoxicology* 1981;2:515-525.
16. Jensen JS, Sylvest A, Trap B, Jensen JC. Genotoxicity of acrylic bone cements. *Pharmacology & Toxicology* 1991;69:386-397.
17. Linder L. Tissue reaction to methyl methacrylate monomer. A comparative study in the rabbit's ear on the toxicity of methyl methacrylate monomer of varying composition. *Acta Orthop Scand* 1976;47:3-10.
18. Martins F, Castro M, Monteiro J, Couto FS, Pinto R, Toscano JMG. Acrylic bone cement induces the production of free radicals by cultured human fibroblasts. *Biomaterials* 1997;18:1133-1135.
19. Morejón L. Evaluación preclínica del cemento Bonacryl. Genotoxicidad. Agencia CCEEM. Cuba, 1994.

20. Morejón L. Aspectos básicos sobre la toxicología de cementos óseos acrílicos. *Revista de plásticos modernos* 1999;77:90-98.
21. Muelas S, di Maio R, Cerecetto H, Seoane G, Ochoa C, Escario JA, Gómez-Barrio A. New thiadiazine derivatives with activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Folia Para* 2001;48:105-108.
22. Newens AF, Volz GR. Severe hipotension during prosthetic hip surgery with acrylic bone cement. *Anesthesiology* 1972;36:298-310.
23. Pegum JS, Medhurst FA. Contact dermatitis from penetration of rubber gloves by acrylic monomer. *Br Med J* 1971;2:141-148.
24. Reynolds JEF. *Martindale: the extra pharmacopoeia*. London: The Pharmaceutical Press, 1989.
25. Schachtschabel DO, Blenke BA. Effect of pulverized implantation materials (plastic and glass ceramic) on growth and metabolism of mammalian cell cultures. *Eur Surg Res* 1976;8:71-78.
26. Schuh FT, Schuh SM, Viguera MG, Terry RN. Circulatory changes following implantation of methyl methacrylate bone cement. *Anesthesiology* 1973;39:455-462.
27. Sheinin EB, Benson WR, Brannon WL. Determination of methyl methacrylate in surgical acrylic cement. *J Pharm Sci* 1976;65:280-283.
28. Singh AR, Lawrence WH, Autian J. Embryonic – fetal toxicity and teratogenic effects of a group of methacrylate esters in rats. *J Dent Res* 1972;51:1632-1640.
29. Taira M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J. Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts. *Int J Prosth* 2000;13:311-314.
30. Taningher M, Pasquini R, Bonatti S. Genotoxicity analysis of N, N-dimethylaniline and N, N-dimethyl-*p*-toluidine. *Envirom Mol Mutagen* 1993;21:349-358.
31. Tansy MF, Kendall FM, Benhayem S, Hohen-Leitner FL, Landin WE, Gold M. Chronic biological effects of methyl methacrylate vapor. I. Body and tissue weights, blood chemistries, and intestinal transit in the rat. *Environ Res* 1976;11:66-78.
32. Tuchmann- Duplessis H. Teratogenic drug screening. Present procedures and requirements. *Teratology* 1972;5:271-279.
33. Turek S. *Ortopedia. Principios y aplicaciones Tomo II*. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1982. p. 1914.

34. Vallittu PK, Miettinen V, Alakuijala P. Residual monomer content and its release into water from denture base materials. *Dent Mater* 1995;11:338-342.
35. Valls O, del Castillo B. Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. Barcelona: Ediciones Piro, 1998.

6. ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS AL EMPLEO DE CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

En la actualidad, el ámbito de la cirugía ortopédica muestra cada vez un mayor interés hacia la búsqueda de alternativas terapéuticas al empleo de los cementos óseos acrílicos como dispositivos de liberación local de fármacos. Este interés surge por varios motivos entre los que cabe destacar en primer lugar la característica de no biodegradabilidad de este material de implantación lo cual hace que en ocasiones se requiera una segunda intervención quirúrgica para su retirada. Por otra parte, la difícil optimización de la cesión de fármaco a partir de la matriz extremadamente hidrófoba de PMMA, hace que en la actualidad no existan comercializadas nuevas formulaciones que garanticen al mismo tiempo un adecuado control en la liberación y además consigan mantener sus buenas propiedades mecánicas.

En esta Tesis Doctoral la investigación de estas alternativas terapéuticas se ha centrado en dos líneas de investigación diferentes. La primera de las cuales consiste en el desarrollo de formulaciones obtenidas mediante el empleo de polímeros biodegradables controladores de la cesión. Por otra parte la segunda línea de investigación se dirige a la obtención de formulaciones desarrolladas a partir de materiales biocerámicos debido a sus buenas características de biocompatibilidad y osteointegración.

6a. ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS BASADAS EN EL EMPLEO DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES

6a.1. INTRODUCCIÓN

Los biomateriales se pueden clasificar en dos grupos teniendo en cuenta el tiempo que deben mantener su funcionalidad. Los primeros (bioestables) deben mantenerla durante el resto de la vida del paciente. El segundo grupo (biodegradables) incluye a los biomateriales que deben mantener una funcionalidad adecuada durante un periodo de tiempo limitado, ya que el organismo humano puede desarrollar mecanismos de curación o regeneración tisular para reparar la zona o el tejido afectado (Vallet-Regi y Munuera, 2000).

En 1987 la Sociedad Europea de Biomateriales denominó “biodegradación” al proceso en el que un agente biológico es el componente dominante del proceso degradativo. Sin embargo, en 1991, se dio una definición más práctica de biodegradación, como la destrucción gradual de un material mediada por un sistema biológico, lo que implica que el sistema biológico no tiene porque ser la causa del proceso de degradación sino solamente el medio en el que se produce.

Las principales ventajas del empleo de estos sistemas biodegradables es en primer lugar que el proceso de degradación constituye un mecanismo útil para eliminar el biomaterial después de haber concluido su función. En segundo lugar la degradación también ofrece la oportunidad de que pueda conseguirse un proceso de curación óptimo con la recuperación total de la funcionalidad del sistema fisiológico. Entre los requerimientos exigidos a los materiales biodegradables cabe destacar que no solo los materiales de partida deben de ser inocuos sino que también deben de serlo sus productos de degradación y por lo tanto ninguno de ellos debe de ser mutagénico, carcinógeno, antigénicos, tóxicos o teratógenos. Otros de los requisitos exigibles a estos materiales es que tanto los productos de partida como los productos de degradación no deben entorpecer la regeneración tisular e incluso es aconsejable que los productos degradados sean solubles en el medio fisiológico.

En cuanto a su origen, los polímeros biodegradables se pueden dividir en polímeros naturales y sintéticos. Los polímeros naturales ofrecen la ventaja de ser muy similares y a menudo idénticos a las sustancias macromoleculares naturales frente a las que el medio biológico está preparado para reconocer y metabolizar. De esta manera, se pueden evitar en principio los problemas de estimulación de un reacción inflamatoria crónica. Sin embargo, los polímeros naturales son frecuentemente bastante inmunogénicos (especialmente las proteínas). Por otra parte, debido a que son estructuralmente más complejos que los polímeros sintéticos su manipulación tecnológica es más complicada. Todo ello hace que en la actualidad se suele preferir el empleo de los materiales biodegradable sintéticos para el desarrollo de sistemas implantables de liberación

controlada. Con la intención de conseguir que por una parte sean bien tolerados por el organismo receptor y por otra parte permitan controlar de forma eficaz la liberación de los distintos fármacos que se puedan incluir en este tipo de sistemas (antibióticos, antiinflamatorios no esteroídicos, antitrombóticos, antineoplásicos, anestésicos, hormonas, proteínas y péptidos) (Habib y col., 1999), (Soriano y Évora, 2000), (Sánchez y col., 2001), (Sampath y col., 1992), (Bozdag y col., 2001), (Conti y col., 1995), (Jiao y col., 2001), (Ike y col., 1991), (Ike y col., 1992), (Sukukara y col., 1992), (Niwa y col., 1993), (Le Corre y col., 1994), (Polakovic y col., 1999), (Heya y col., 1991), (Birbaum y col., 2000), (Lam y col., 2001), (Soriano y col., 1995).

La mayoría de los polímeros biodegradables contienen grupos funcionales sensibles a procesos hidrolíticos como éster, carbonato, anhídrido, uretano, ortoéster o amida aunque los compuestos más utilizados, como los poliésteres alifáticos, contienen ésteres de ácidos carboxílicos. Cuando un implante a base de polímeros biodegradables es introducido en el ambiente fisiológico, el agua penetrará en la matriz polimérica, comenzando la hidrólisis de los enlaces inestables hidrolíticamente. Existen gran número de factores que pueden influir en el comportamiento degradativo de los polímeros biodegradables: factores físico químicos, el tipo de enlace lábil, el mecanismo de hidrólisis (catalítico o no catalítico), las características del polímero (temperatura de transición vítrea, peso molecular, presencia de aditivos, etc.), el carácter hidrofílico/hidrofóbico e incluso la morfología, el lugar de implantación o las dimensiones del implante (Vallet-Regi y Munuera, 2000).

Los poli- α -hidroxiácidos (polímeros de ácido láctico y glicólico) son actualmente los polímeros biodegradables sintéticos de mayor uso, así como los más ampliamente investigados. Los poli- α -hidroxiácidos más usados son el poliácido láctico (PLA) y los copolímeros de ácido láctico y glicólico (PLGA). Estos polímeros presentan muy baja reacción tisular y una mínima toxicidad, ya que los productos de degradación (ácido glicólico y ácido láctico) son metabolitos que participan en los ciclos de asimilación clásicos, ciclo de Krebs, siendo eliminados posteriormente como dióxido de carbono y agua (Athanasiou y col., 1996), (Jalil y Nixon, 1990), (Tice y Tabibi, 1991), (Wu, 1995), (Lewis, 1990), (Kitchell y Wise, 1985), (Cohen y col., 1994), (Tice y Cowsar, 1984). Por lo tanto estos dos polímeros biodegradables sintéticos son los seleccionados para el desarrollo de distintas formulaciones en la presente Tesis.

Con estos polímeros se han elaborado comprimidos matriciales de implantación debido en primer lugar a su facilidad de fabricación así como a su sencilla manipulación por parte del personal sanitario. Por lo que son una de las formas farmacéuticas más ampliamente estudiadas entre los distintos sistemas de liberación controlada (Takahashi y col., 2004), (Murakami y col., 2000), (Pohja y col., 2004).

Por otra parte se han elaborado sistemas multiparticulares concretamente microesferas ya que gracias a la inclusión del fármaco en el interior de estos sistemas es posible conseguir una cesión gradual y sostenida del mismo. La velocidad y duración de la liberación del principio activo pueden ser determinadas mediante la selección del tamaño de partícula. Además estos sistemas presentan una gran estabilidad física, química y microbiológica (Ramos y col., 2000).

6a.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6a.2.1. MATERIALES

Los polímeros sintéticos biodegradables utilizados en este estudio son poli (D, L-láctico-co-glicólico), PLGA 50:50, Resomer[®] RG 503 H ($P_m= 28$ kDa); poli (D, L-láctico-co-glicólico), PLGA 50:50, Resomer[®] RG 504 H ($P_m= 53$ kDa); poli (D, L-láctico), Resomer[®] R 206 ($P_m= 102$ kDa); poli (L-láctico), Resomer[®] L 210 ($P_m= 300$ kDa) comprados en Boehringer Ingelheim (Alemania). Poli (D, L-láctico-co-glicólico), PLGA 70:30 ($P_m= 12$ kDa) que fue suministrado gratuitamente por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Madrid, España). Poli (caprolactona) ($P_m= 65$ kDa); poli (caprolactona) ($P_m= 80$ kDa) y ácido polisebácico que se obtuvieron de Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

El fármaco sulfato de gentamicina USP empleado fue suministrado gratuitamente por los laboratorios C.E.P.A., S.A. (Madrid, España).

La solución salina tamponada de pH 6,0 y pH 7,4 empleadas en nuestros ensayos se prepararon según se detalla en la Farmacopea Americana (USP 26). Todos los productos empleados fueron obtenidos de Panreac Química, S.A. (Barcelona, España).

Polivinil alcohol (PVA 15.000) y el diclorometano utilizados para la elaboración de las microesferas se obtuvieron respectivamente de Fluka (Suiza) y Panreac Química, S.A. (Barcelona, España). El etanol usado en la elaboración de los comprimidos se obtuvo de Panreac Química, S.A. (Barcelona, España).

Para la preparación del reactivo *o*-ftaldialdehído, usado para el análisis espectrofotométrico del sulfato de gentamicina, se emplearon *o*-ftaldialdehído y 2-mercaptoetanol obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España), metanol obtenido de Lab-Scan (Dublín, Irlanda) y borato sódico obtenido de Panreac Química, S.A. (Barcelona, España).

6a.2.2. ESTUDIO DE INTERFERENCIA ANALÍTICA DE DISTINTOS POLÍMEROS BIODEGRADABLES CON EL SULFATO DE GENTAMICINA

Con la finalidad de descartar una posible interferencia de los polímeros biodegradables con el método analítico del antibiótico se comprobaron las lecturas espectrofotométricas de las muestras de los distintos polímeros, preparadas por triplicado, que se introducen en los viales de forma que la cantidad de los mismos sea igual a la que contienen los comprimidos. Estas muestras se analizan a la misma longitud de onda que el sulfato de gentamicina ($\lambda = 332$ nm). Los polímeros biodegradables estudiados fueron: Poli (caprolactona) ($P_m = 65$ kDa); poli (caprolactona) ($P_m = 80$ kDa); ácido polisebácico; poli (D, L-láctico), Resomer[®] R 206; poli (L-láctico), Resomer[®] L 210; poli (D, L-láctico-co-glicólico), PLGA 50:50, Resomer[®] RG 503 H; poli (D, L-láctico-co-glicólico), PLGA 50:50, Resomer[®] RG 504 H. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron al cabo de 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 y 6 semanas.

6a.2.3. ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD PRINCIPIO ACTIVO: EXCIPIENTES UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DE COMPRIMIDOS

Este estudio de compatibilidad se realizó mediante el empleo de la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las medidas de DSC se llevaron a cabo empleando un calorímetro diferencial de barrido Mettler-Toledo 820 (Mettler Toledo, Suiza) conectado a un sistema de enfriamiento que funciona con nitrógeno líquido. La escala de temperatura se calibró usando las temperaturas de fusión del indio y del zinc. Para realizar el ensayo se emplearon cápsulas de aluminio selladas y con un agujero en la tapa como la de referencia y las muestras pesaron aproximadamente 5,0 mg. Todas las muestras se calentaron a una velocidad de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno.

Las muestras analizadas fueron el sulfato de gentamicina, los polímeros biodegradables Resomer[®] RG 503 H y Resomer[®] RG 504 H y las mezclas físicas de los mismos en una proporción principio activo: polímero (1:5).

6a.2.4. PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN DE COMPRIMIDOS MATRICIALES DE IMPLANTACIÓN

La elaboración de los comprimidos matriciales, biodegradables para implantación comenzó con un proceso previo de la tamización de los componentes (tamiz de luz de malla de 1 mm) tras lo cual se realizó un proceso de mezclado. Para cada una de las formulaciones se comprobó la eficacia de mezclado en un mínimo de 5 muestras por lote de forma que se garantizase que en todos los casos el coeficiente de variación fuese inferior al 5%.

Se prepararon comprimidos con la técnica de compresión directa, así como mediante una granulación previa a la compresión. Las formulaciones que contienen el polímero Resomer® RG 503 H fueron las obtenidas mediante compresión directa y las que contienen el polímero Resomer® RG 504 H fueron sometidas a un proceso de granulación previo con etanol 96%, el porcentaje de este agente humectante empleado fue del 24%, tras lo cual se forzó el paso de la masa plástica a través de un tamiz de luz de malla de 1 mm.

Las proporciones de principio activo y polímeros biodegradables empleados en las distintas formulaciones se encuentran recogidas en la siguiente tabla.

Tabla 1. Composición de los comprimidos de implantación.

FORMULACIONES	SULFATO DE GENTAMICINA (%)	RESOMER® RG 503 H (%)	RESOMER® RG 504 H (%)
503:10	10	90	—
503:20	20	80	—
504:10	10	—	90
504:20	20	—	80
504:30	30	—	70

El proceso de compresión se realizó en una máquina de comprimir excéntrica Bonals modelo B-40 (J. Bonals, España). Se empleó un juego de punzones planos biselados de 12 mm, ajustándose el peso de los comprimidos en todos los casos a 500 mg.

6a.2.5. RESISTENCIA A LA FRACTURA

Los estudios de resistencia a la fractura se realizaron por sextuplicado en un equipo Pharma Test PTB 311 (Pharma Test, Alemania) y los resultados se expresaron en Newtons.

6a.2.6. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN “IN VITRO” DEL ANTIBIÓTICO EN COMPRIMIDOS DE IMPLANTACIÓN

El estudio de velocidad de disolución de estos comprimidos se realizó en 3 ml de tampón PBS pH 7,4, en viales de 5 ml que se introdujeron en un baño de agitación termostaticado a $37 \pm 0,1$ °C y las tomas de muestra fueron a las 2; 8; 24; 48; 72 y 96 horas y posteriormente al cabo de 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 y 6 semanas. Se tomaron en cada muestra 3 ml y se añadió la misma cantidad de medio de disolución fresco. Las muestras se analizaron usando el método espectrofotométrico UV propuesto por Zhang después de la derivatización con *o*-phtaldialdehído. Cada experimento se realizó por sextuplicado.

6a.2.7. ESTUDIO DE TOXICIDAD DEL SULFATO DE GENTAMICINA EN LÍNEA CELULAR

Se ha realizado un estudio de toxicidad celular sólo de la gentamicina ya que los polímeros empleados en la obtención de los comprimidos y de las microesferas presentan una seguridad reconocida incluso por vía parenteral. Las concentraciones estudiadas de gentamicina parten desde la concentración mínima inhibitoria 4 µg/ml; hasta una concentración 800 veces superior (3200 µg/ml) y se estudió en la línea celular de macrófagos (Línea J774).

6a.2.8. PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN DE MICROESFERAS

Las microesferas se prepararon por el método de doble emulsión con evaporación de solvente (Singh y col., 2001), (Prior y col., 2000) (ver Esquema 1). Se elaboraron 4 lotes, sin ultrasonificación (lote nº 1) y con sonda de ultrasonidos (lotes nº 2, 3 y 4). La composición de los distintos lotes se puede ver en la Tabla 2.

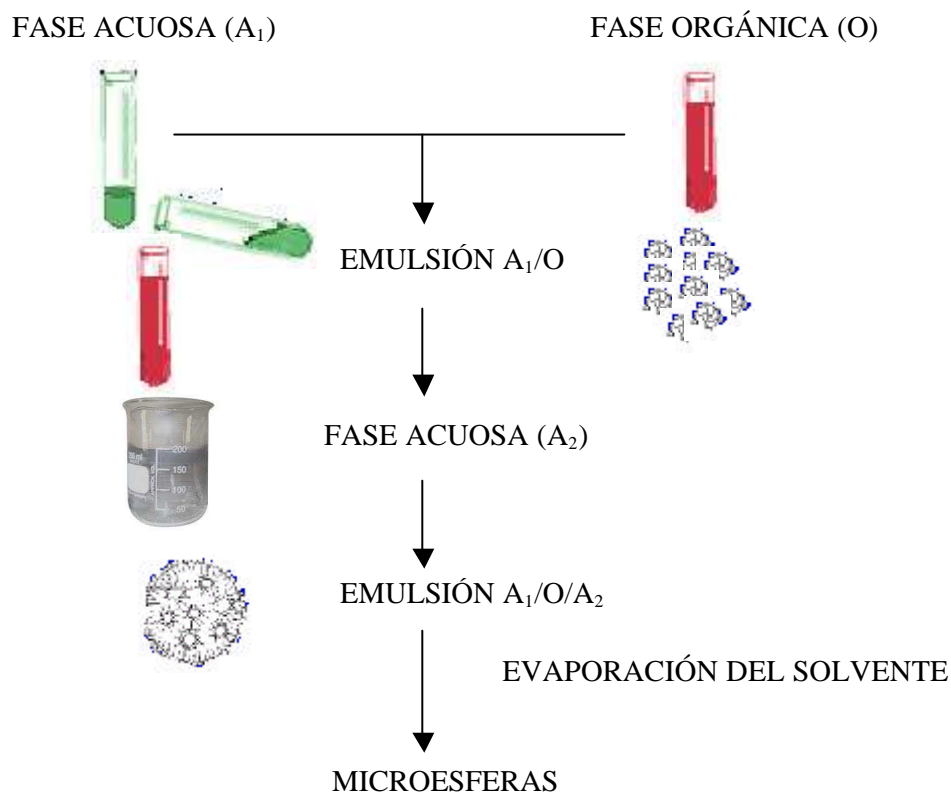
Tabla 2. Composición de los distintos lotes elaborados de microesferas.

LOTE	MÉTODO	POLÍMERO	SULFATO DE GENTAMICINA (%)	POLÍMERO (%)
1	Sin ultrasonic.	Resomer® RG 503 H	1	99
2	Con ultrasonic.	Resomer® RG 503 H	1	99
3	Con ultrasonic.	PLGA 70:30	1	99
4	Con ultrasonic.	Resomer® R 206	1	99

El método de doble emulsión sin ultrasonificación se desarrolló de la siguiente manera. El sulfato de gentamicina se disolvió en una solución salina tamponada (10 mM, pH 6,0) formando la primera fase acuosa (A₁). La fase orgánica estaba compuesta por diclorometano y el polímero. Estas soluciones se emulsificaron usando un agitador del alta velocidad T 25 basic Ultra-Turrax® (Ika®, Alemania) a 11.000 rpm durante 2 min. para formar la emulsión primaria A₁/O. Posteriormente esta emulsión A₁/O se vertió sobre una solución salina tamponada (pH 7,4) que contenía polivinil alcohol (PVA) al 2% y se homogeneizó con un agitador del alta velocidad T 25 basic Ultra-Turrax® (Ika®, Alemania) a 11.000 rpm durante 2 min.

La emulsión A₁/O/A₂ se agitó a 500 rpm durante 4 horas a temperatura ambiente para la evaporación del diclorometano. Las microesferas se recogieron por centrifugación a 9.000 rpm durante 20 minutos, posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada. Finalmente las microesferas se liofilizaron y se conservaron a 4 °C.

El método de doble emulsión con ultrasonificación se desarrolló de la misma manera que el descrito anteriormente, la diferencia es que la primera emulsión se obtuvo utilizando una sonda de ultrasonidos Sonifier 250 (Branson, Reino Unido) durante 30 s manteniendo la muestra fría con hielo.



Esquema 1. Elaboración de microesferas por el método de doble emulsión con evaporación de solvente.

6a.2.9. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS

ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA Y EL TAMAÑO DE LAS MICROESFERAS

La morfología de las microesferas se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio Jeol JSM-6400 (Japan Electrón Optics Lab., Tokio 196, Japón) que trabaja a una tensión de aceleración de 20 kV y su resolución máxima es de 35 Å. Las muestras se recubrieron con una fina lámina de oro para favorecer su conductividad.

El tamaño de las micropartículas de cada lote se determinó mediante difracción de rayos láser (Galai[®] Cis-1).

ESTUDIO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Los estudios de difracción de rayos X se realizaron con un difractómetro Philips X'Pert-MPD PW3050. Las distintas muestras son expuestas a una radiación Cu K α monocromatizada. Se exploró la zona comprendida entre 5°-50°2 θ ; tamaño de paso 0,04° (2 θ) y tiempos de conteo 1 segundo por paso.

EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN

El nivel de carga del sulfato de gentamicina en las microesferas se determinó disolviendo aproximadamente 20 mg de microesferas en 1,5 ml de NaOH 1 N, agitándose a temperatura ambiente toda la noche. El sulfato de gentamicina se analizó espectrofotométricamente a $\lambda = 332$ nm después de la reacción de derivatización con *o*-ftaldialdehído. El estudio se realizó por triplicado.

ESTUDIO DE LIBERACIÓN "IN VITRO" DEL ANTIBIÓTICO EN MICROESFERAS

La cesión del sulfato de gentamicina desde las microesferas se determinó por el método de diálisis (Lee y col., 2002). Las muestras se suspendieron en 0,5 ml tampón salino pH 7,4 y se transfirieron a una bolsa de diálisis (Colodion Sartorius® 20 kD). Esta bolsa se introdujo en un vial de 20 ml que contenía también la solución salina tamponada pH 7,4. El ensayo se mantuvo a $37 \pm 0,1$ °C y se mantuvo en agitación magnética. A intervalos determinados de tiempo, se retiraron alícuotas de 1 ml y se reemplazaron con medio de disolución fresco. Las muestras se analizaron usando el método espectrofotométrico UV propuesto por Zhang después de la derivatización con *o*-phtaldialdehído. Cada experimento se realizó por triplicado.

6a.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6a.3.1. ESTUDIO DE INTERFERENCIA ANALÍTICA DE DISTINTOS POLÍMEROS BIODEGRADABLES CON EL SULFATO DE GENTAMICINA

En la siguiente tabla se muestran los resultados de las lecturas espectrofotométricas de los distintos polímeros biodegradables estudiados. En todos los casos los valores de las lecturas espectrofotométricas se van incrementando a medida que se prolonga el tiempo de experimentación. Para la elaboración de los comprimidos de implantación de sulfato de gentamicina solamente se han empleado en el presente trabajo los copolímeros de ácido láctico y glicólico Resomer® RG 503 H y Resomer® RG 504 H. El mayor valor de lectura de las muestras de Resomer® RG 503 H $0,0114 \pm 0,02$ se obtuvo al cabo de las seis semanas de ensayo y en el caso del polímero Resomer® RG 504 H el valor máximo llegó a ser de $0,0162 \pm 0,02$ (ver Tabla 3). En todos los casos las lecturas espectrofotométricas de las muestras que contienen gentamicina son de al menos 0,190 U.A. (20 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina) por lo que se pueden considerar despreciable los bajos valores de absorbancia atribuibles al polímero. Debido a lo cual se concluye que no existe interferencia analítica con el método espectrofotométrico empleado entre los copolímeros de PLGA y el sulfato de gentamicina.

Aunque en la formulación de comprimidos de implantación no se han utilizado otros polímeros biodegradables en el posterior trabajo de desarrollo de microesferas de gentamicina si se ha empleado el ácido poliláctico L-206. El valor máximo de lectura de este polímero al cabo de las 6 semanas de ensayo es de $0,0132 \pm 0,01$ por lo que se puede considerar que este polímero tampoco interfiere en el método de determinación cuantitativo empleado para la gentamicina (ver Tabla 3).

El resto de polímeros biodegradables estudiados tampoco presentan altos valores de absorbancia (ver Tabla 3) por lo que pueden ser empleados en la preparación de formulaciones con gentamicina que posteriormente vayan a ser evaluados con el mismo método de determinación empleado en el presente trabajo.

Tabla 3. Medidas de absorbancia medias de cada polímero a lo largo del tiempo y su desviación estándar.

POLIMERO	ABS 1S	ABS 1,5S	ABS 2S	ABS 3S	ABS 4S	ABS 5S	ABS 6S
Poli (caprolactona) 65 kDa	0	0,0059±0,01	0,0075±0,01	0,0088±0,01	0,0097±0,01	0,0146±0,01	0,0189±0,01
Poli (caprolactona) 80 kDa	0	0	0,0015±0,002	0,0048±0,007	0,0009±0,001	0,0114±0,01	0,0193±0,01
Polisebácico Resomer® L 210	0	0	0	0,0011±0,002	0,0037±0,005	0,0102±0,01	0,0473±0,03
Resomer® L 210	0	0,0009±0,001	0,0014±0,002	0,0029±0,005	0,0037±0,006	0,0059±0,01	0,0218±0,04
Resomer® R 206	0	0	0,0004±0,0007	0,0035±0,005	0,0035±0,006	0,0064±0,01	0,0132±0,01
Resomer® RG 503 H	0	0,0006±0,001	0,0026±0,004	0,0054±0,009	0,007±0,01	0,0105±0,01	0,0114±0,01
Resomer® RG 504 H	0	0	0	0,0043±0,007	0,0043±0,007	0,0076±0,01	0,0162±0,02

6a.3.2. ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD PRINCIPIO ACTIVO: EXCIPIENTES UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DE COMPRIMIDOS

En la siguiente figura (Fig. 1) se muestra la curva de DSC correspondiente al sulfato de gentamicina. En dicha curva se observa un pico endotérmico amplio a 105,33 °C correspondiente a pérdida de agua y un pico a 244 °C, correspondiente a la fusión y descomposición de dicho fármaco (Rosenkrantz y col., 1980), (Merck Index, 1996).

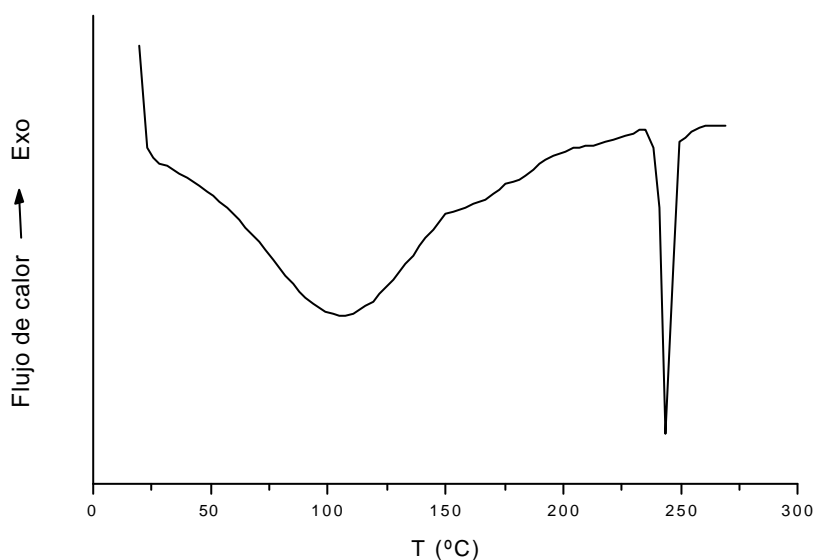


Figura 1. Curva de DSC del sulfato de gentamicina.

En la siguiente figura (Fig. 2) se muestran las curvas de DSC correspondientes a los polímeros Resomer[®] RG 503 H y Resomer[®] RG 504 H, que presentan su T_g a 54,83 °C y 56,67 °C respectivamente.

En la Fig. 3 se muestran las curvas de DSC correspondientes a las mezclas físicas gentamicina: polímero en las que se aprecia en primer lugar la T_g de los polímeros aproximadamente a 55 °C y en segundo lugar el pico de descomposición de la gentamicina a 244 °C que se superpone con una posible descomposición del polímero. Por lo tanto se puede concluir que no existe incompatibilidad entre la gentamicina y ambos polímeros de PLGA pudiendo por tanto ser empleados en la formulación de comprimidos matriciales de implantación.

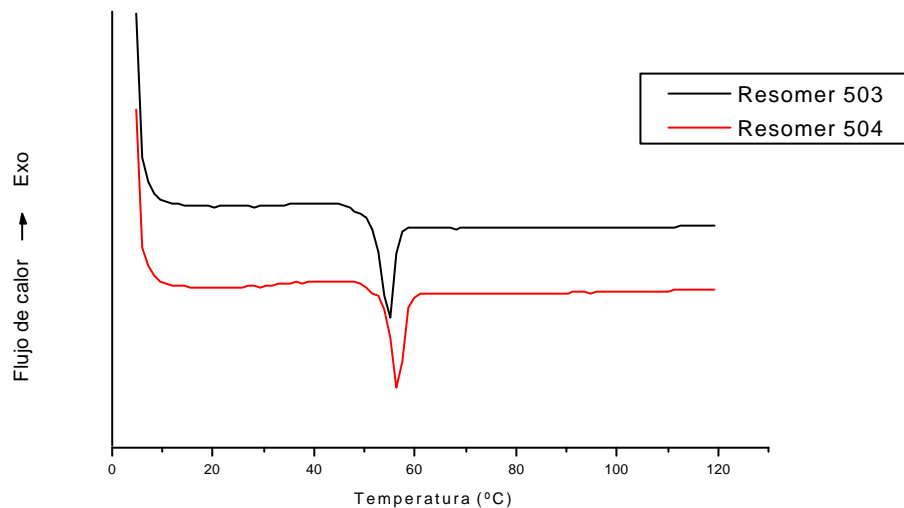


Figura 2. Curva de DSC de los polímeros Resomer[®] RG 503 H y Resomer[®] RG 504 H.

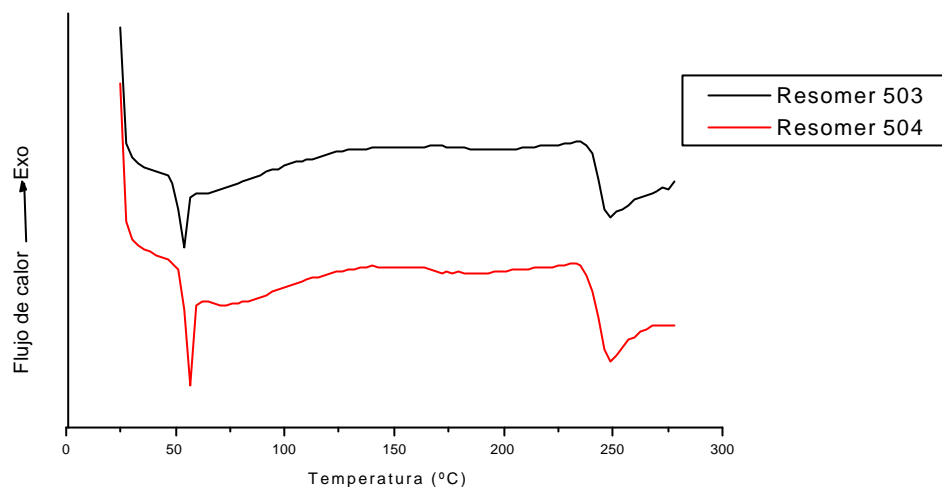


Figura 3. Curvas de DSC de la mezcla física de los polímeros Resomer[®] RG 503 H y Resomer[®] RG 504 H y el sulfato de gentamicina.

6a.3.3. RESISTENCIA A LA FRACTURA

En la Tabla 4 se muestran los valores medios de resistencia a la fractura y las respectivas desviaciones estándar de las distintas formulaciones.

El polímero Resomer[®] RG 504 H tiene unas mejores características de compresibilidad que el 503 por lo que con las formulaciones que contienen este polímero (Resomer[®] RG 504 H) se consiguen obtener comprimidos de mayor resistencia a la fractura. Los valores de resistencia a la fractura fueron respectivamente 120,9; 170,9; 190,1 Nw para las formulaciones 504:10, 504:20, 504:30 frente a los valores de 76,6 Nw y 82,6 Nw de las formulaciones 503:10, 503:20 respectivamente.

Tabla 4. Valores medios de resistencia a la fractura de las distintas formulaciones con su desviación estándar.

FORMULACIÓN	RESISTENCIA A LA FRACTURA (Nw)
503:10	76,6 ± 0,13
503:20	82,6 ± 0,10
504:10	120,9 ± 0,11
504:20	170,9 ± 0,12
504:30	190,1 ± 0,11

6a.3.4. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN “IN VITRO” DEL ANTIBIÓTICO EN COMPRIMIDOS DE IMPLANTACIÓN

Todas las formulaciones de comprimidos preparadas presentan una rápida cesión inicial del fármaco como se puede observar en la Figura 4 (Perfiles de cesión distributivos). Las formulaciones con menor cesión inicial son aquellas que contienen un 10% de fármaco y entre ambas la cesión inicial es menor cuando el polímero empleado es el Resomer® RG 503 H. Sin embargo, en la Figura 5 (Perfiles de cesión acumulativos), se aprecia que la cesión se controla mejor con el Resomer® RG 504 H, ya que estas formulaciones presentan una cesión más prolongada en el tiempo. La mayoría de las formulaciones pierde la forma al cabo de las 3-4 semanas del ensayo, lo que por una parte permitirá el crecimiento óseo en sustitución de la formulación en la cavidad ósea y además facilita la liberación de la gentamicina que aún contienen estos comprimidos de implantación ósea. Así por ejemplo, la formulación de Resomer® RG 504 H con un 20% de gentamicina cede incluso un 1,97% en la última semana del ensayo con lo que durante todo el ensayo se garantiza una concentración de antibiótico de 9,85 µg/ml que supera la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI = 4 µg/ml). Durante las primeras 24 horas los porcentajes cedidos de las distintas formulaciones varían entre un 86% en el caso de la formulación 504-20%, y un 96% en el caso de la formulación 503-20%, lo que suponen respectivamente concentraciones locales de gentamicina de 430 µg/ml y 480 µg/ml teniendo en cuenta un posible volumen de distribución local de 200 ml.

Perfiles de cesión distributivos

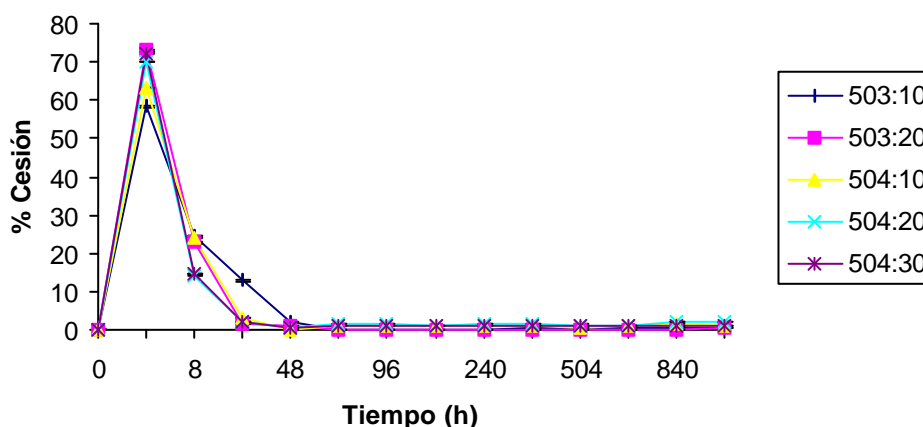


Figura 4. *Perfiles de cesión distributivos del sulfato de gentamicina en las distintas formulaciones de comprimidos de implantación estudiadas.*

Perfiles de cesión acumulativos

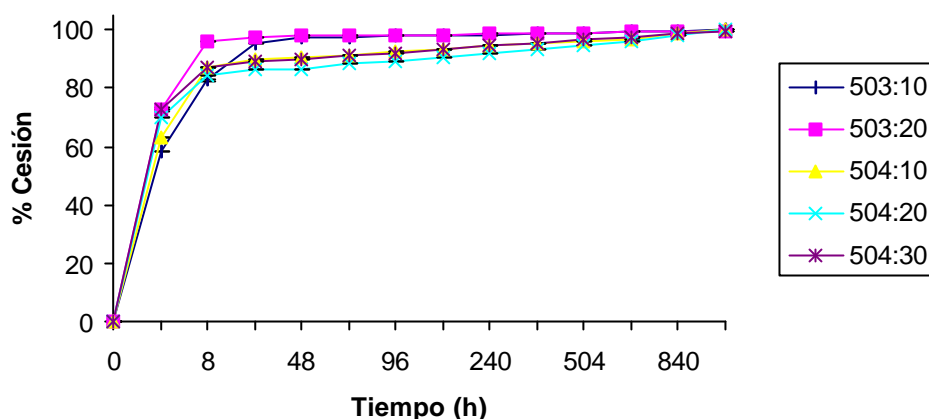


Figura 5. Perfiles de cesión acumulativos del sulfato de gentamicina en las distintas formulaciones de comprimidos de implantación estudiadas.

6a.3.5. ESTUDIO DE TOXICIDAD DEL SULFATO DE GENTAMICINA EN LÍNEA CELULAR

En la Tabla 5 se recogen todos los valores obtenidos del estudio de citotoxicidad de la gentamicina en líneas celulares de macrófagos. Debido a que todos los porcentajes de citotoxicidad obtenidos son inferiores al 50% se puede considerar que ninguna de las concentraciones de gentamicina estudiadas (4-3200 µg/ml) son citotóxicas.

Por lo tanto se puede concluir que las concentraciones máximas de gentamicina (480 µg/ml) que originan los comprimidos matriciales obtenidos no son concentraciones citotóxicas.

Tabla 5. Resultados del estudio de citotoxicidad del sulfato de gentamicina en macrófagos.

CONCENTRACIÓN (µg/ml)	CITOTOXICIDAD (%)
4	0 ± 0,01
32	0 ± 0,01
100	0 ± 0,01
400	10,89 ± 0,2
1000	14,25 ± 0,1
1300	14,67 ± 0,3
1600	25,56 ± 0,3
3200	34,14 ± 0,2

6a.3.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS

ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA Y EL TAMAÑO DE LAS MICROESFERAS

Las microesferas del lote n° 1, blancas y con fármaco, (ver Figs. 6 y 7) fueron esféricas de superficie lisa pero con numerosos pequeños poros. Las microesferas presentaron una distribución heterogénea y un diámetro medio comprendido entre 2-50 μm .

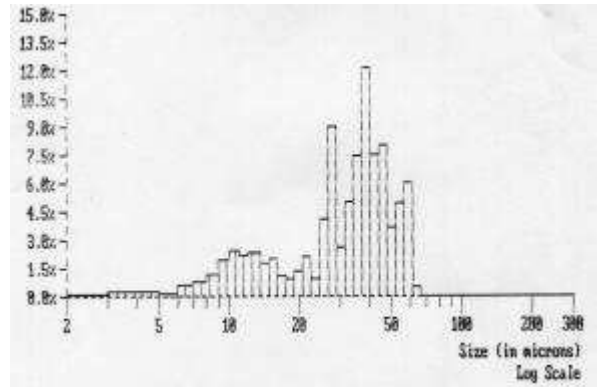
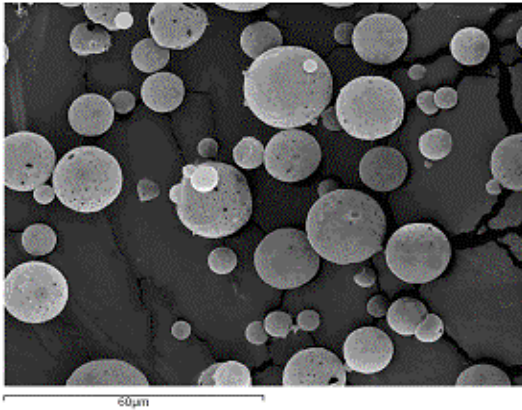


Figura 6. Morfología y tamaño de las microesferas blancas del lote 1.

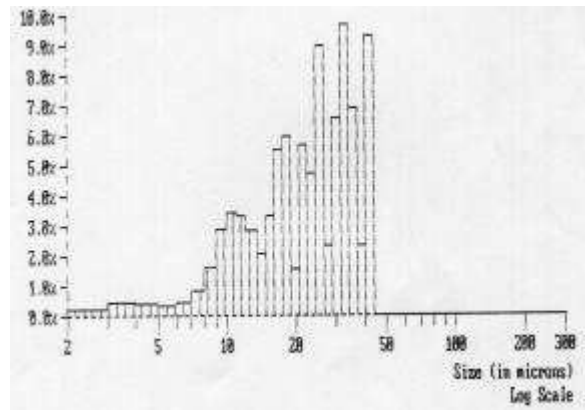
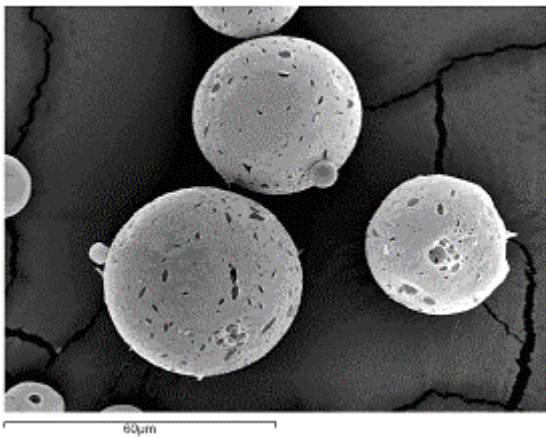


Figura 7. Morfología y tamaño de las microesferas con sulfato de gentamicina del lote 1.

Las microesferas del lote 2, blancas y con fármaco, (ver Figs. 8 y 9) fueron también esféricas de superficie lisa y también presentaron muchos poros pequeños. Estas microesferas presentaron una distribución de tamaño de partícula más homogénea que las del lote 1. Presentaron un diámetro medio de 30 μm .

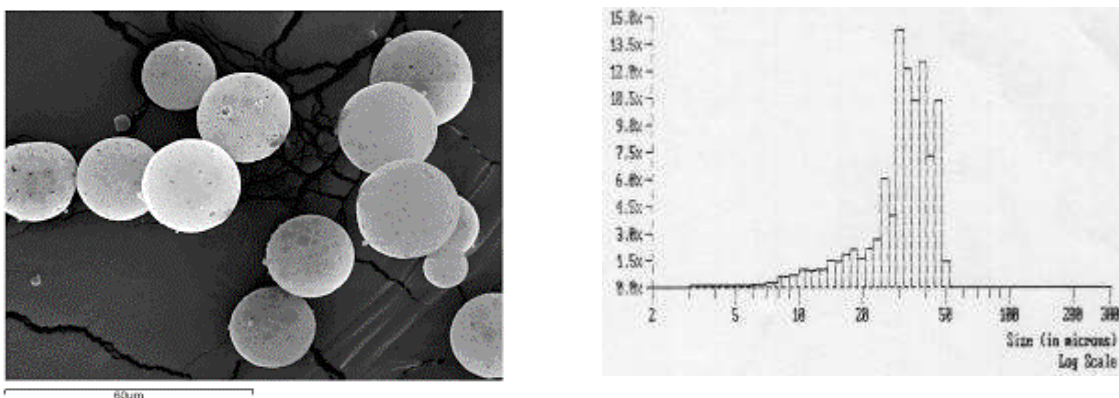


Figura 8. Morfología y tamaño de las microesferas blancas del lote 2.

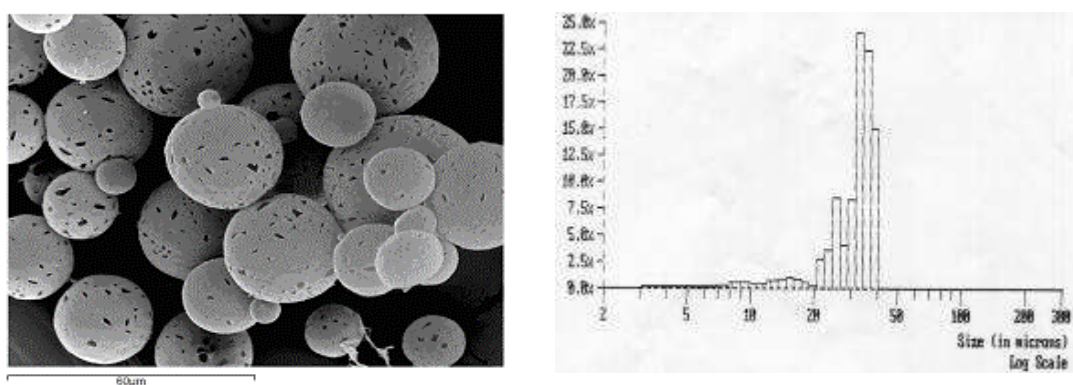


Figura 9. Morfología y tamaño de las microesferas con sulfato de gentamicina del lote 2.

Las microesferas del lote 3, tanto las blancas como las de fármaco, (ver Figs. 10 y 11) fueron también esféricas pero con una superficie rugosa y presentaron menos poros que los lotes 1 y 2. Estas microesferas presentaron un diámetro medio de 45 μm .

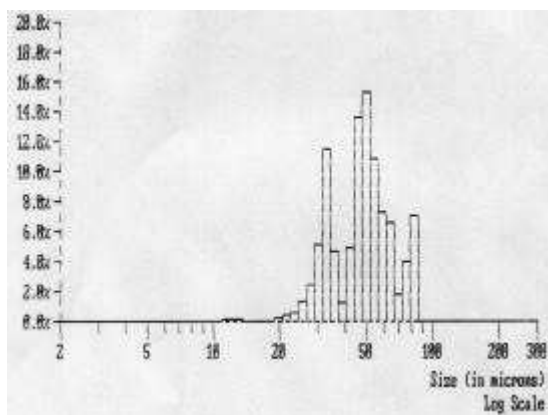
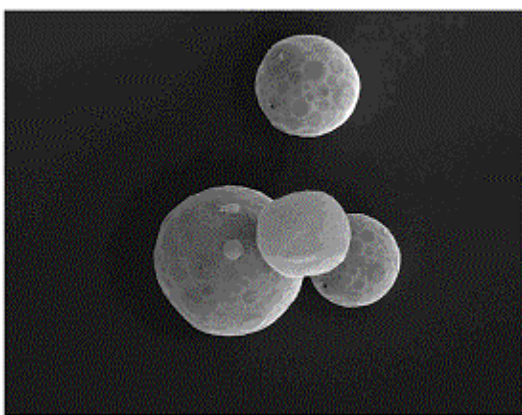


Figura 10. Morfología y tamaño de las microesferas blancas del lote 3.

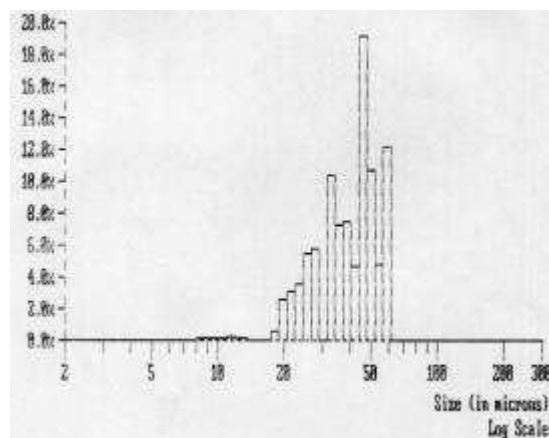
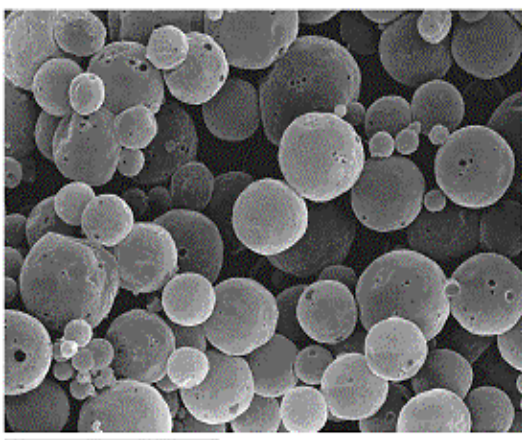


Figura 11. Morfología y tamaño de las microesferas con sulfato de gentamicina del lote 3.

Las microesferas del lote 4 de poliláctico, tanto las blancas como las que contenían fármaco (ver Figs. 12 y 13), presentaron una superficie perfectamente lisa sin poros. La distribución de tamaño fue homogénea con un diámetro medio de 38 μm .

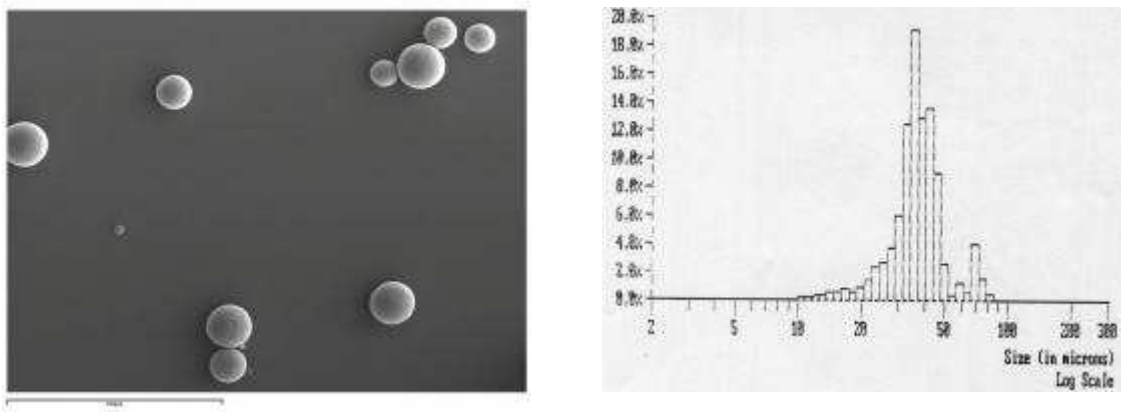


Figura 12. Morfología y tamaño de las microesferas blancas del lote 4.

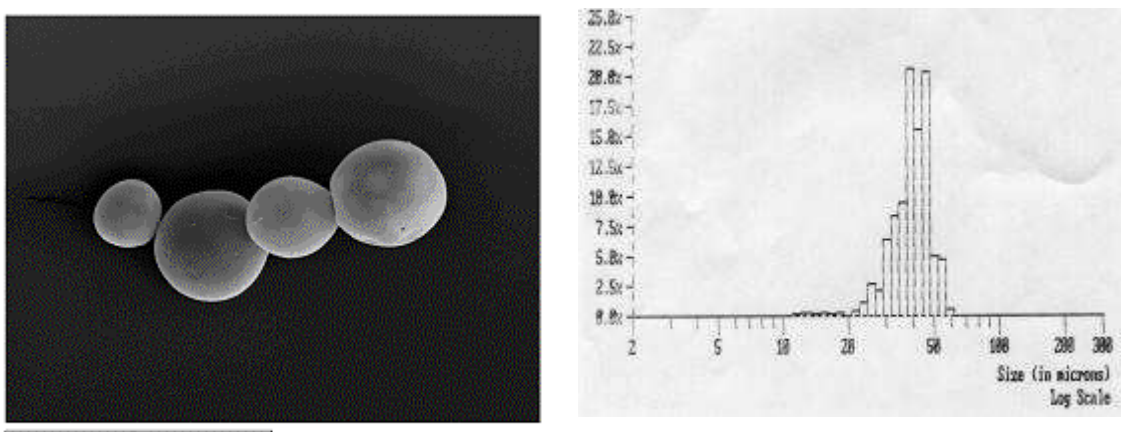


Figura 13. Morfología y tamaño de las microesferas con sulfato de gentamicina del lote 4.

ESTUDIO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

El sulfato de gentamicina y los polímeros incluidos en las microesferas son amorfos y por lo tanto todos los difractogramas presentaron halos amorfos.

En el difractograma del lote 1 las microesferas cargadas presentaron 3 picos que corresponde con un residuo cristalino de fosfato de di-hidrógeno de potasio (KH_2PO_4) del PBS empleado en la elaboración de las microesferas. Este residuo cristalino apareció pero con menor intensidad en muchos de los difractogramas de las microesferas que contenían PLGA.

El difractograma del lote 4 fue bastante diferente al resto de los difractogramas de los otros lotes presentando una intensidad bastante más baja en el halo amorfo.

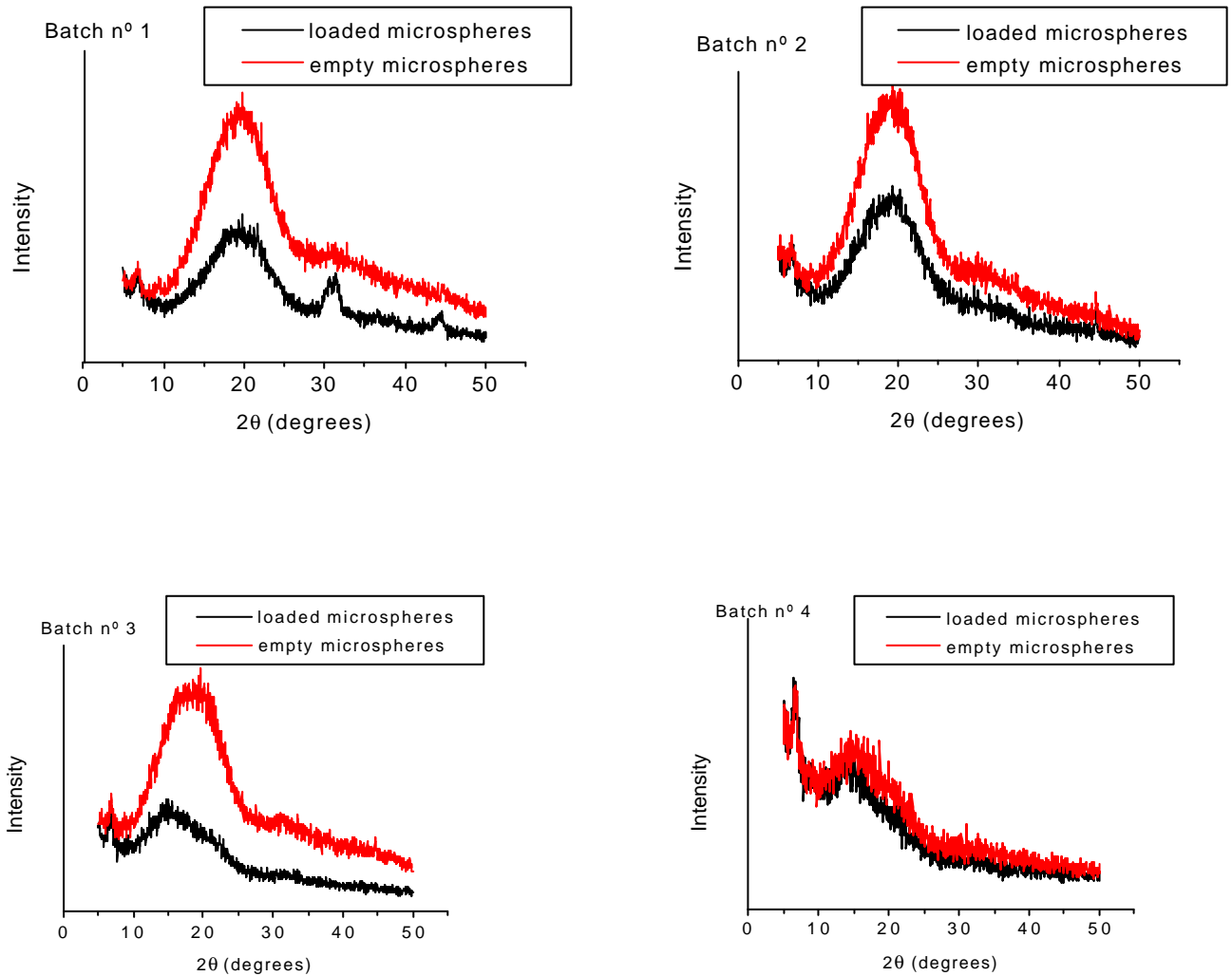


Figura 14. Difractogramas de los distintos lotes de microesferas elaborados.

EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN

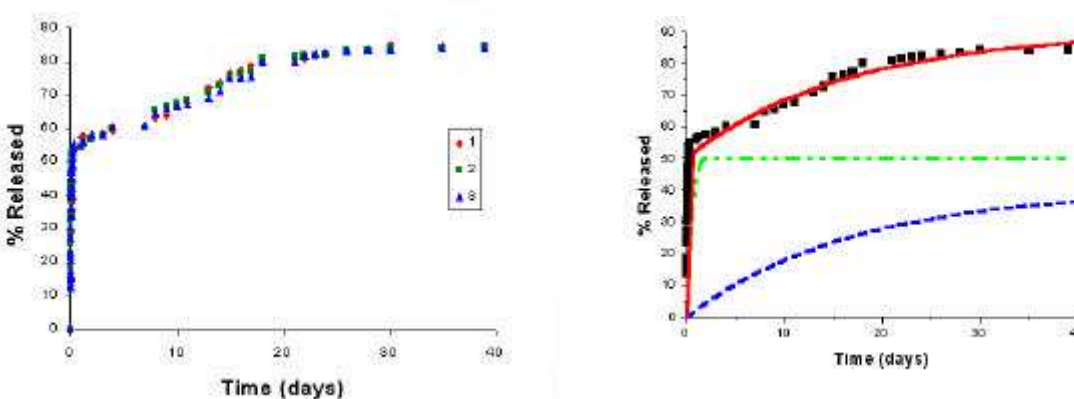
La Tabla 6 presenta la eficacia de encapsulación de los diferentes lotes de microesferas. El excelente resultado de la eficacia de encapsulación del lote 2 obtenido por el método de ultrasonificación, determinó su inclusión en los estudios de cesión *in vitro* del fármaco. En dichos estudios se realizó una comparación entre el lote 1, microesferas obtenidas sin ultrasonificación y el lote 2 ya que las microesferas tenían la misma composición solo se diferenciaban en el método de elaboración.

Tabla 6. Resultados de eficacia de encapsulación.

LOTE	EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN (%)
1	17,84 ± 0,71
2	97,94 ± 0,18
3	68,70 ± 1,84
4	53,01 ± 0,76

ESTUDIO DE LIBERACIÓN “IN VITRO” DEL ANTIBIÓTICO EN MICROESFERAS

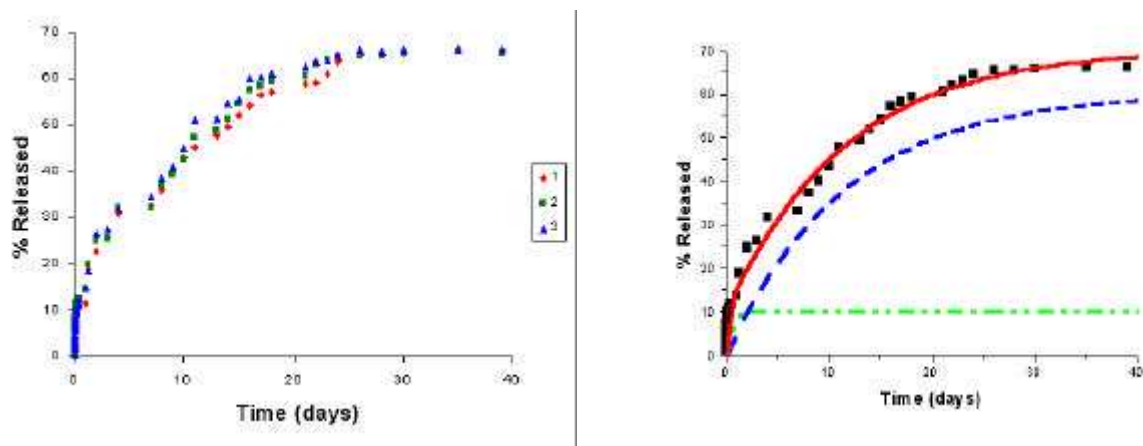
En la Fig. 15 se puede ver la cesión de gentamicina en el lote 1. A la izquierda se puede ver la cantidad acumulada de gentamicina cedida frente al tiempo. Estas microesferas presentaron una cesión muy rápida en las primeras horas. Esto se debe a los poros de las microesferas que se vieron en las fotos de microscopía electrónica de barrido. A la derecha se pueden ver las dos cinéticas de cesión de la gentamicina. Estas cinéticas de disolución se ajustan a una ecuación que representa la suma de dos ecuaciones diferentes. El 50% de la gentamicina encapsulada se cedió a alta velocidad y el 31% de la gentamicina encapsulada se cedió a una menor velocidad.



$$\% \text{ Released} = 50.41 (1 - e^{-23.48t}) + 30.89 (1 - e^{-0.061t})$$

Figura 15. Cesión del sulfato de gentamicina desde el lote 1.

En la Fig. 16 se puede ver la cesión de gentamicina en el lote 2. A la izquierda se puede ver la cantidad acumulada de gentamicina cedida frente al tiempo. El perfil de cesión es completamente diferente al anterior. Estas microesferas presentan una cesión sostenida durante más de 5 semanas. A la derecha se pueden ver las dos cinéticas de cesión de la gentamicina. Estas cinéticas de disolución se ajustan a una ecuación que representa la suma de dos ecuaciones diferentes. El 10% de la gentamicina encapsulada se cedió a alta velocidad y el 60% de la gentamicina encapsulada se cedió a una menor velocidad.



$$\% \text{ Released} = 60.47 (1 - e^{-0.087t}) + 10.06 (1 - e^{-24.46t})$$

Figura 16. Cesión del sulfato de gentamicina desde el lote 2.

6a.4. BIBLIOGRAFIA

1. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996;17:93-102.
2. Birnbaum DT, Kosmala JD, Henthorn DB, Brannon-Peppas L. Controlled release of β -estradiol from PLGA microparticles: The effect of organic phase solvent on encapsulation and release. *J Control Release* 2000;65:375-387.
3. Bozdag S, Calis S, Kas HS, Ercan MT, Peksoy I, Hincal AA. In vitro evaluation and intra-articular administration of biodegradable microspheres containing naproxen sodium. *J Microencapsulation* 2001;18(4):443-456.
4. Cohen S, Alonso MJ, Langer R. Novel approaches to controlled-release antigen delivery. *Int J Technol Assessment Health Care* 1994;10(1):121-130.
5. Conti B, Genta I, Modena T, Pavanetto F. Investigation on process parameters involved in poly lactide-co-glycolide microspheres preparation. *Drug Dev Ind Pharm* 1995;21:615-622.

6. Habib M, Onyilofor S, Ebube NK, Owusu-Ababio G. Preparation and characterization of ofloxacin microspheres for the eradication of bone associated bacterial biofilm. *J Microencapsulation* 1999;16:27-37.
7. Heya T, Okada Y, Ogawa Y, Toguchi H. Factors influencing the profiles of TRH release from copoly (d,l lactic/glycolic acid) microspheres. *Int J Pharm* 1991;72:199-205.
8. Ike O, Shimizu Y, Ikada Y. Degradation and antitumor effect of adriamycin containing poly (L lactic acid) microspheres. *Biomaterials* 1991;12:757-762.
9. Ike O, Shimizu Y, Wada R, Hyon SH, Ikada Y. Controlled cisplatin delivery system using poly (DL lactic acid). *Biomaterials* 1992;13:230-234.
10. Jalil R, Nixon JR. Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparation techniques and release properties. *J Microencapsulation* 1990;7:297-325.
11. Jiao Y, Ubrich N, Hoffart V, Marchand-Arvier M, Vigneron C, Hoffman M, Maincent P. Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits. *J Pharm Sci* 2001;91(3):760-768.
12. Kitchell JP, Wise DL. Poly (lactic/glycolic acid) biodegradable drug-polymer matrix systems. *Methods Enzymol* 1985;112:436-448.
13. Lam XM, Duenas ET, Cleland JL. Encapsulation and stabilization of nerve growth factor into poly (lactic-co-glycolic) acid microspheres. *J Pharm Sci* 2001;90:1356-1365.
14. Le Corre P, Le Guevello P, Gajan V, Chevanne F, Le Verge R. Preparation and characterization of bupivacain-loaded poly-lactide and polylactic-co-glycolic acid microspheres. *Int J Pharm* 1994;107:41-49.
15. Lee WK, Park JY, Yang EH, Suh H, Kim SH, Chung DS, Choi K, Yang CW, Park JS. Investigation of the factors influencing the release rates of cyclosporin A-loaded micro-and nanoparticles prepared by high-pressure homogenizer. *J Control Release* 2002;84:115-123.
16. Lewis DH. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin M, Langer R, editors. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 1-41.
17. Merck, and Co. *Merck index*, 12th ed. New York: Chapman & Hall, 1996.
18. Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, Kawashima Y. Utilization of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles for preparation of mini-depot tablets by direct compression. *J Control Release* 2000;67:29-36.

19. Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kamashima Y. Preparation of biodegradable nanospheres of water soluble and insoluble drugs DL-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method and the drug release behaviour. *J Control Release* 1993;25:89-98.
20. Pohja S, Suihko E, Vidgren M, Paronen P, Ketolainen J. Starch acetate as a tablet matrix for sustained drug release. *J Control Release* 2004;94:293-302.
21. Polakovic M, Gorner T, Gref R, Dellacherie E. Lidocaine loaded biodegradable nanospheres. II. Modelling of drug release. *J Control Release* 1999;60(2):169-177.
22. Prior S, Gamazo C, Irache JM, Merkle HP, Gander B. Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating *Brucella* infections. *Int J Pharm* 2000;196:115-125.
23. Ramos D, Gómez M, Fernández D, Núñez de la Fuente L. Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Rev Cubana Farm* 2000;34(1):70-77.
24. Rosenkrantz BE, Greco JR, Hoogerheide JG, Oden EM. Gentamicin sulfate. In: Florey K, editor. *Analytical profiles of drug substances*, Vol. 9. New York: Academic Press, 1980. p. 310-311.
25. Sampath SS, Garvin K, Robinson DH. Preparation and characterization of biodegradable poly (L-lactic acid) gentamicin delivery systems. *Int J Pharm* 1992;78:165-174.
26. Sánchez E, Baro M, Soriano I, Perera A, Évora C. In vivo-in vitro study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants. *Eur J Pharm Biopharm* 2001;52:151-158.
27. Singh M, Shirley B, Bajwa K, Samara E, Hora M, O'Hagan D. Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles. *J Control Release* 2001;70:21-28.
28. Soriano I, Évora CM, Llabrés M. Liberación de insulina desde microesferas de DL-PLA. I Congreso Hispano-Luso de Liberación Controlada. Santiago de Compostela: Proceedings, 1995.
29. Soriano I, Évora C. Formulation of calcium phosphates/poly (*d,l*- lactide) blends containing gentamicin for bone implantation. *J Control Release* 2000;68:121-134.
30. Sukukara CH, Takahashi T, Hagiwara A. Controlled release of cisplatin from lactic acid oligomer microspheres incorporating cisplatin: *in vitro* studies. *J Control Release* 1992;22:69-73.
31. Takahashi M, Onishi H, Machida Y. Development of implant tablet for a week-long sustained release. *J Control Release* 2004;100:63-74.

32. Tice TR, Cowsar DR. Biodegradable controlled-release parenteral systems. *Pharm Technol* 1984;11:26-35.
33. Tice TR, Tabibi ES. Parenteral drug delivery: injectables. In: Kydonieus A, editor. *Treatise on controlled drug delivery: fundamentals optimisation, applications*. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 315-339.
34. United States Pharmacopeia 26. United States Pharmacopeial convention. Rockville, 2003.
35. Vallet-Regi M, Munuera L. *Biomateriales: aquí y ahora*. Madrid: Dykinson, 2000.
36. Wu XS. Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. In: Wise et al., editors. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 1015-1054.

6b. PASTAS DE HIDROXIAPATITA PARA CESIÓN LOCAL DE FÁRMACOS

6b.1. INTRODUCCIÓN

El uso de biomateriales cerámicos es bien conocido en odontología pero su uso en otro tipo de implantes médicos es relativamente nuevo. La principal ventaja de las cerámicas en comparación con otros materiales es que tienen muy baja reactividad química, lo que les hace inertes y por lo tanto biocompatibles. Desde el punto de vista mecánico, se caracterizan por una gran resistencia a la compresión y menor a la tracción, alta resistencia a la erosión, y con propiedades de baja fricción en la articulación así como por ser quebradizos y rígidos. Las propiedades de baja fricción son reforzadas por el hecho de que sus superficies pueden ser tratadas hasta alcanzar límites muy altos de pulido, lo que nos daría una superficie que podría soportar grandes cargas frente a ella misma o frente a materiales poliméricos en el medio fisiológico. Por otra parte, poseen una alta conductividad para favorecer la adherencia celular y tisular. Las biocerámicas, naturales o sintéticas, usadas individualmente o con materiales adicionales orgánicos o poliméricos, son las más prometedoras entre todos los biomateriales usados en la reparación de tejidos duros y blandos (Ben-Nissan, 2003).

Mientras que los materiales sintéticos son ampliamente usados en el campo biomédico, los materiales de origen natural recientemente han empezado a ser considerados como una fuente abundante de materiales para nuevas aplicaciones biomédicas. Las biocerámicas naturales, tales como las procedentes de los esqueletos animales (hidroxiapatita o carbonato cálcico), son producidas a través de métodos de optimización natural para soportar y mantener físicamente una variedad de tejidos en múltiples funciones. Durante la última década, el incremento del estudio de la biomineralización ha determinado una gran mejora en los métodos biomiméticos de síntesis y en la producción de biomateriales de nueva generación. Reacciones en la interfaz mediadas por monocapas de surfactante y polímeros revelaron muchas analogías con los procesos de biomineralización natural (Tang y col., 2003). La síntesis de complejos inorgánicos, basados en estructuras naturales que pueden imitar a soportes naturales, sobre los que se produce el anclaje de las células, ofrece una variedad de posibilidades para la construcción de una nueva generación de análogos óseos para ingeniería tisular.

El hueso contiene macro- y micro-poros, que están interconectados para permitir que los fluidos y nutrientes necesarios para el organismo puedan ser transportados, haciendo del hueso una estructura extremadamente compleja. Muchos investigadores han probado a imitar las cualidades únicas del hueso, sin embargo es prácticamente imposible copiarlas o emularlas adecuadamente. Muchas cuestiones han ido dirigidas a producir materiales óseos sintéticos; propiedades,

morfología y estructura, tipo y fracción de volumen de los poros, el estado de la interfaz y velocidades de degradación.

Cuando un material sintético se introduce en el cuerpo humano, los tejidos reaccionan hacia el implante de diversas maneras dependiendo del tipo de material y de las cargas funcionales aplicadas. Las únicas sustancias que no presentan ningún tipo de rechazo por parte del organismo son las producidas por él mismo (autógeno) sin embargo, las otras sustancias que son reconocidas como extrañas, inician algún tipo de reacción. El mecanismo de interacción tisular al nivel de nano-escala depende de la respuesta tisular en la superficie del implante. En general, tres términos describen o clasifican un biomaterial con respecto a la respuesta tisular. Éstos son bioinertes, bioreabsorbibles y bioactivos, quedando recogidos estos términos en numerosas referencias bibliográficas (Hench, 1988), (LeGeros, 1988), (Kokubo y col., 2000), (deGroot, 1987).

Además de la biocompatibilidad y de la interacción tisular, otros factores tales como materiales usados, carga funcional, estado del paciente, edad y técnica quirúrgica usada también tienen un papel importante en la adaptabilidad y longevidad del implante.

La fracción mineral ósea está compuesta de láminas nano-cristalinas, hidroxiapatita (HAp). La apatita ósea puede ser descrita mejor como carbonato de hidroxiapatita (CHA) y por la fórmula $(Ca, Mg, Na)_{10}(PO_4, CO_3)_6(OH)_2$. La composición del (CHA) comercial es similar a la apatita mineral ósea (LeGeros, 1988).

En general las biocerámicas de fosfato cálcico naturales y sintéticas son osteoconductoras (tienen la capacidad de favorecer el crecimiento tisular y la formación de hueso) y no osteoinductivas (capacidad para formar hueso cuando se implantan en lugares donde no existe tejido óseo). Algunas aplicaciones ortopédicas y dentales de las biocerámicas de fosfato de calcio incluyen reparación de defectos óseos, reparación de defectos periodontales, aumento de la cresta alveolar, implantes auditivos, implantes oculares, reconstrucción maxilofacial, fusión de la espina dorsal, relleno de espacios óseos, aditivos de cementos óseos y recubrimientos de implantes. El injerto de hueso se usa actualmente en cirugía para el tratamiento de defectos en la caña diafisal, defectos de no unión y de relleno metafisal y reconstrucción mandibular. Estos son los problemas que suponen un mayor reto en cirugía ortopédica y maxilofacial. Grandes defectos en el hueso debido a traumas, tumores, remodelado periprotético u osteolisis inducida por partículas representan un reto clínico ya que hoy en día las opciones terapéuticas son limitadas.

El injerto de hueso autógeno puede ser osteogénico (que forma hueso), osteoconductor (no tiene capacidad para inducir o formar hueso pero proporciona un soporte inerte en el cual el tejido óseo puede regenerar hueso), u osteoinductor (estimula a las células para someterse a una conversión fenotípica hacia células de tipo osteoprogenitor para formar hueso). Actualmente no

hay sustitutos para hueso autógeno; hay, sin embargo, alternativas sintéticas. Mientras que el autoinjerto continua siendo el “estándar de oro” hay muchas situaciones donde el suministro del hueso es limitado o la calidad puede ser inapropiada. La extracción del hueso para el injerto aumenta la morbilidad, el tiempo de cirugía y la pérdida de sangre, que son inconvenientes clínicos significantes.

Los aloinjertos se han usado como una alternativa del autoinjerto, pero ellos no presentan o presentan una baja osteogenicidad, aumentan la inmunogenicidad y presentan una resorción más rápida que el hueso autógeno. En la práctica clínica, los aloinjertos frescos se usan poco a causa de la respuesta inmune y el riesgo de transmisión de enfermedades.

Los aloinjertos congelados y liofilizados son osteoconductivos pero son considerados, en el mejor de los casos, débilmente osteoinductivos. La liofilización disminuye la solidez estructural del aloinjerto, por lo tanto este tipo de aloinjertos no pueden ser usados en situaciones donde se requiere que el injerto actúe como soporte estructural. Los aloinjertos a granel se pueden utilizar para el tratamiento de defectos óseos segmentales. La incorporación biológica de los aloinjertos es un proceso lento e incompleto (Enneking y Mindel, 1991). Se conoce muy bien su uso para reconstrucción después de resección de tumores de hueso, sin embargo no es común en reconstrucción después de un trauma, cuando se requiere normalmente el alargamiento y transporte del hueso.

El hueso, por su química, estructura y morfología, difiere respecto a la implantación de los órganos sólidos y los tejidos revascularizados. El hueso se regenera utilizando recursos autógenos incluyendo células, citoquinas y vasos sanguíneos, sin tener en cuenta la fuente del material del injerto. Se sabe que el hueso comparte, con otros órganos transplantables y tejidos, la capacidad de inducir una variedad de respuestas inmunológicas considerando su naturaleza alogénica y xenogénica (Friedlaender y col., 2003).

Materiales derivados sintéticamente de varias fuentes incluyendo las fuentes naturales se han usado como injertos de hueso en un intento para mejorar las limitaciones del autoinjerto y aloinjerto (Keating y McQueen, 2001), (Moore y col., 2001). Sin embargo la composición química y la estructura física de las hidroxiapatitas naturales, sin duda las más parecidas a la del tejido óseo circundante, son obviamente menos inmunogénicas que las apatitas sintéticas. Para utilizar la hidroxiapatita natural, sin embargo, es necesario completamente eliminar la matriz orgánica responsable de la reacción inmunogénica que puede finalmente comprometer la integración del material en el sitio de implantación. Hasta ahora el método más extendido para purificar la matriz mineral ósea obtenida de fuentes animales ha sido el uso combinado de solventes químicos y tratamiento con calor, que apenas puede garantizar el mantenimiento de los requisitos de la

estructura histológica y química (Raynaud y col., 2002). Por esta razón, es de gran interés el desarrollo de nuevas tecnologías para preparar y obtener matrices minerales óseas de reducido contenido proteico. El hipoclorito de sodio (NaClO), se ha usado previamente para eliminar los componentes orgánicos de los materiales biológicos (Nakamura y col., 1985), (Schiller y col., 1995).

Por otro lado, recientemente, se ha centrado mucho la atención en la combinación de HAp con polímeros naturales (Itoh y col., 2002), (Zhao y col., 2002), (Murugan y Panduranga, 2002), (Murugan y Panduranga, 1998) y con polímeros sintéticos (Wang y col., 2002), (Murugan y Panduranga, 2003, a), (Murugan y Panduranga, 2003, b).

La hidroxiapatita se ha usado como sistema de implantación para la cesión de diversos fármacos tales como proteínas, polipéptidos, esteroides, aminoácidos, vacunas y antibióticos (Bajpai, 1989).

El objetivo de este trabajo fue estudiar si los compuestos de pastas que contienen partículas óseas obtenidas por tratamiento químico de hueso de animal para eliminar la matriz orgánica pueden ser aplicados a la cesión sostenida de ibuprofeno, ibuprofeno lisina y defibrotide. Diversos aditivos se examinaron para formular estas pastas hidrofílicas de hidroxiapatita para facilitar la inmovilización de las partículas y así mejorar su consistencia.

6b.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6b.2.1. MATERIALES

Las partículas de hidroxiapatita se obtuvieron por una modificación del método previamente descrito por Raspanti y col. (Raspanti y col., 1994) y Guizzardi y col. (Guizzardi y col., 1995).

Brevemente, la muestra estaba constituida por tejido óseo molido (tibia) de caballo o cerdo, negativo al análisis de VIH y de priones. Este material tenía un aspecto molido de color rojo por la presencia de sangre coagulada, conteniendo todavía matriz orgánica constituida por músculos, tendones y grasa. El hueso se almacenó en el congelador a -20 °C en bolsas cerradas de polietileno.

El procedimiento de desproteínización se basa en la capacidad oxidativa del hipoclorito sódico (NaClO) y en el tratamiento térmico a altas temperaturas. El hipoclorito sódico blanquea la superficie del hueso y oxida el material orgánico con la formación de compuestos solubles en agua, mientras que con el tratamiento térmico la oxidación ocurre también en el corazón de las partículas óseas.

El primer paso del proceso consistió en la descongelación rápida del hueso molido. Después, el material se lavó durante 2 horas con una mezcla de etanol y éter etílico (30:70 v/v) para eliminar la parte grasa que se encontraba en el hueso molido. Después de la filtración y el secado al aire el material se suspendió en una solución acuosa de hipoclorito sódico (4,9% p/v) calentándose a 95 °C durante 1 hora. Los vapores formados se reciclaron utilizando un condensador Allihn.

En la última fase, el material se filtró y se secó a 40 °C durante 15 horas para así obtener un polvo seco. Éste se molió y se tamizó para recoger la fracción de tamaño de partícula de 90-250 µm.

El polvo obtenido se calentó a 350 °C durante 10 horas en un horno.

Los excipientes usados para formular las pastas hidrofilicas de hidroxiapatitas fueron polietilenglicoles (PEG 300, HOECHST AG, Alemania; PEG 1500, A.C.E.F. S.p.A., Italia; PEG 10000, A.C.E.F. S.p.A., Italia), alginato sódico (ALG, Carlo Erba Milán, Italia), quitosano (CS, A.C.E.F. S.p.A., Italia), gliceril monoestearato (GMS, Fluka, Suiza), e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC, Methocel® K100M CR Premium, Colorcon, Orpington, Reino Unido).

Los fármacos modelo empleados para formular los sistemas de cesión de fármacos implantables fueron ibuprofeno (IB), ibuprofeno lisina (IBL) ambos de Lisapharma S.p.A., Erba, Italia y defibrotide (DF) (Crinos S.p.A., Villaguardia, Italia).

La solución salina de tampón fosfato a pH 7,4, usada como medio de disolución, se preparó disolviendo en 1000 ml de agua destilada 5,98 g de fosfato disódico hidrógeno dodecahidrato (Carlo Erba Analyticals, Milán, Italia), 0,19 g de fosfato potásico dihidrógeno (Carlo Erba Analyticals, Milán, Italia), y 8,8 g de NaCl (fuerza iónica 0,154 M). La solución antes de ser usada se filtró y se desgasificó.

6b.2.2. PREPARACIÓN DE PASTAS DE HIDROXIAPATITA

Se prepararon once formulaciones con distintos porcentajes de fármaco, hidroxiapatita y excipientes. Su composición queda recogida en la Tabla 1.

Para la preparación de estas pastas de hidroxiapatita, los PEGs sólidos se fundieron a 80 °C al baño María. Posteriormente los otros componentes se añadieron y se mezclaron vigorosamente en un mortero utilizando el pistilo a una temperatura entre 40 y 45 °C. Cuando la pasta se formó, se dividió manualmente en especímenes cilíndricos de 1 gramo cada uno.

Antes de ser ensayados los especímenes se guardaron a temperatura ambiente en un desecador con sílica gel.

Tabla 1. Composición de las pastas utilizadas.

FORMULACIÓN	IBL	IB	DF	HAp	PEG 300	PEG 1500	PEG 10000	ALG	GMS	HPMC	CS
1	-	-	-	65%	20%	-	15%	-	-	-	-
2	-	-	-	62%	22%	8%	8%	-	-	-	-
3	-	-	-	53%	34%	-	13%	-	-	-	-
4	10%	-	-	52%	22%	8%	8%	-	-	-	-
5	-	10%	-	52%	22%	8%	8%	-	-	-	-
6	-	-	-	52%	22%	8%	8%	10%	-	-	-
7	-	-	-	52%	22%	8%	8%	-	-	-	10%
8	-	-	15%	43%	7%	-	14%	-	21%	-	-
9	-	-	15%	43%	12%	-	8%	-	12%	10%	-
10	-	-	15%	43%	12%	-	8%	-	17%	5%	-
11	-	-	15%	33%	12%	-	8%	-	27%	5%	-

6b.2.3. ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN IN VITRO, CESIÓN DEL FÁRMACO Y COMPORTAMIENTO DE HINCHAMIENTO

La Tabla 2 presenta los estudios realizados en cada formulación.

Tabla 2. Estudios realizados en cada formulación.

FORMULACIÓN	ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN	CESIÓN DE FÁRMACO	COMPORTAMIENTO DE HINCHAMIENTO
1	X		
2	X		
3	X		
4		X	
5		X	
6	X		X
7	X		X
8		X	
9		X	X
10		X	X
11		X	X

Los estudios de disolución, cesión del fármaco y comportamiento de hinchamiento se llevaron a cabo en un aparato de disolución de flujo continuo CH-4008 (SOTAX AG BASEL, Suiza). En el método de flujo continuo (USP aparato 4) la muestra ensayada se coloca en una celda de pequeño volumen a través de la cual el solvente es continuamente bombeado a una temperatura de $37 \pm 0,1$ °C. El solvente al salir de la celda se filtra y entonces puede ser analizado.

En este trabajo los especímenes se introdujeron en el interior de un soporte cilíndrico constituido por una red de acero inoxidable de 1 mm de tamaño de malla. El sistema una vez ensamblado se depositó en el interior de la celda de 22,6 mm de diámetro termostatazada a $37 \pm 0,1$ °C y sometida a un flujo continuo de 1,5 ml/min de tampón fosfato pH 7,4. Este flujo se mantuvo por medio de una bomba peristáltica (Esapump, Advanced Products, Italia). El volumen total del medio de disolución fue de 1 litro. Este medio se recogió y se recicló en un matraz Erlenmeyer mantenido a 37 °C en un baño termostatazado.

Durante los estudios de cesión del fármaco, se tomaron muestras de 3 ml del matraz Erlenmeyer, a intervalos prefijados de tiempo, se filtraron con filtros Whatman (0,45 μm) y se analizaron por medio de un espectrofotómetro UV (Jasco V 530). La cantidad de IB, IBL y DF cedida en el medio de disolución se midió a $\lambda = 264 \text{ nm}$, 225 nm y 260 nm respectivamente. Las curvas de calibración obtenidas con los patrones de IB, IBL y DF se usaron para determinar la cantidad de fármaco cedida.

Las cinéticas de disolución/erosión de las formulaciones estudiadas se determinaron retirando de la celda el soporte cilíndrico que contenía la muestra a intervalos prefijados de tiempo y determinando el peso de las muestras.

El comportamiento de hinchamiento para las formulaciones que contienen polímero (6, 7, 9, 10, 11) se determinó midiendo el aumento en longitud que sufría la muestra en función del tiempo durante 30 min. La longitud se midió observando la muestra con un estereomicroscopio (Citoval, Jena, Alemania) en comparación con una referencia calibrada. El porcentaje de hinchamiento ($H\%$) se determinó usando la siguiente ecuación:

$$H\% = \frac{L_t - L_0}{L_0} \times 100$$

donde L_t es la longitud de la muestra después de la inmersión en la solución tampón durante un tiempo t y L_0 es la longitud inicial.

Cada experimento se llevó a cabo por triplicado. Todos los datos se presentan con el valor medio \pm desviación estándar.

6b.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6b.3.1. ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN *IN VITRO*

La Fig. 1 presenta los perfiles de disolución/erosión de las pastas que contienen HAp y PEGs. Las formulaciones 1 y 3 se disolvieron en 50 min. La formulación 2 se disolvió en 1 hora. La formulación 2 contenía un 8% de PEG 1500 y las formulaciones 1 y 3 no lo contenían. Por lo tanto, el PEG 1500 retrasa ligeramente la velocidad de disolución de la pasta.

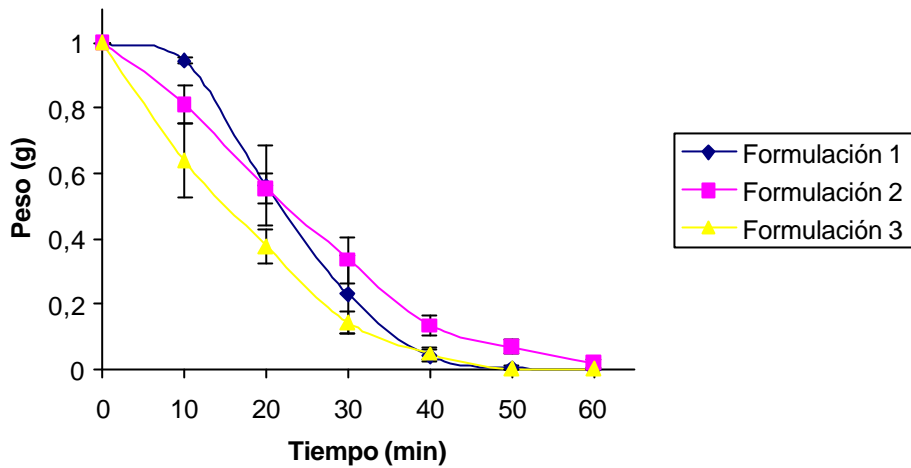


Figura 1. Perfiles de disolución de las pastas de hidroxiapatita con PEGs.

La Fig. 2 muestra el perfil de disolución de la pasta con PEGs y 10% de alginato sódico (Formulación 6). Su disolución fue 5 veces más lenta que las pastas estudiadas previamente. Esta pasta presentó un aumento en peso debido al hinchamiento producido en los primeros 20 min.

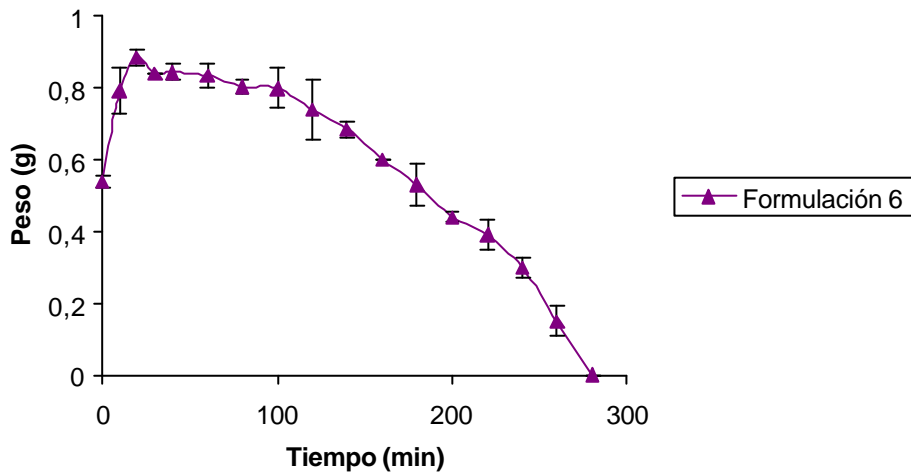


Figura 2. Perfil de disolución de la pasta de hidroxiapatita con 10% de alginato sódico.

En la Fig. 3 se presenta el perfil de disolución de la pasta de hidroxiapatita con PEGs y 10% de quitosano (Formulación 7). La pasta se disolvió completamente en 90 min. Similarmente a la formulación 6, esta pasta presentó hinchamiento en los primeros 20 min.

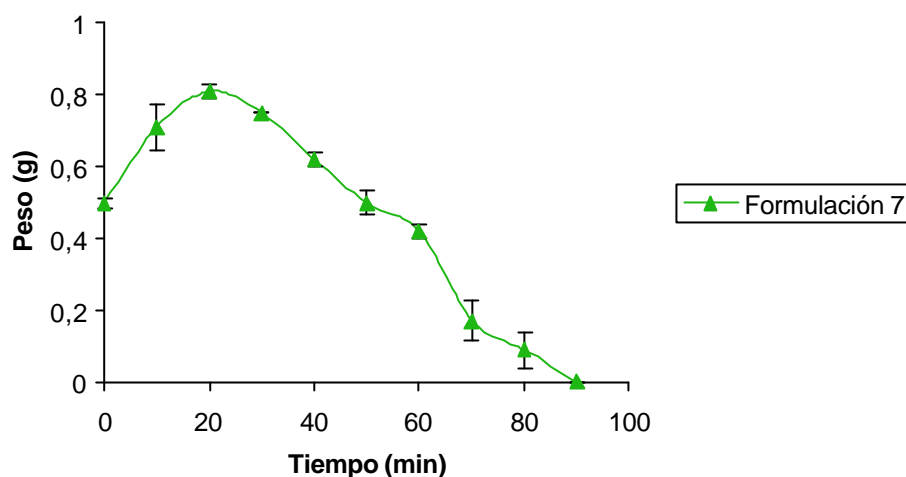


Figura 3. Perfil de disolución de la pasta de hidroxiapatita con 10% de quitosano.

Según los resultados obtenidos la pasta de hidroxiapatita más interesante para desarrollar un sistema de cesión de fármacos es la formulación 2. En efecto, aunque la velocidad de disolución de la pasta con PEGs fue más alta que con alginato sódico o quitosano, esta no presenta hinchamiento. El comportamiento de hinchamiento debe ser considerado un efecto no deseable para los materiales implantables ya que este puede causar inestabilidad mecánica y dolor en el sitio de implante.

6b.3.2. COMPORTAMIENTO DE HINCHAMIENTO

El comportamiento de hinchamiento de las pastas de hidroxiapatita que contienen alginato sódico, quitosano, o HPMC, se estudió midiendo la cinética de imbibición de estas pastas en el medio acuoso.

La Fig. 4 muestra como varía el grado de hidratación (H) con el tiempo de inmersión en la solución tamponada a pH 7,4. Todas las muestras alcanzaron el equilibrio de hidratación entorno a los 20 min, pero el máximo grado de hidratación alcanzado varió dependiendo de la composición de cada formulación.

El mayor grado de hidratación lo presentó la formulación 9 (alrededor del 75%) mientras que la formulación 7 fue la que menor grado de hidratación presentó. Comparando la formulación 9 con la 10 y la 11, se ve como la reducción del contenido de HPMC (desde un 10 a un 5%) produjo un dramático descenso del grado de hidratación observado para las formulaciones 10 y 11. Este comportamiento también puede ser parcialmente atribuido al efecto del contenido de GMS. En efecto, la formulación 10 capta menos agua que la formulación 11, indicando que con la misma cantidad de HPMC y aumentando el GMS resultó una mayor hidratación. La formulación que

contenía alginato sódico presentó un comportamiento intermedio con respecto a las que contenían HPMC y quitosano.

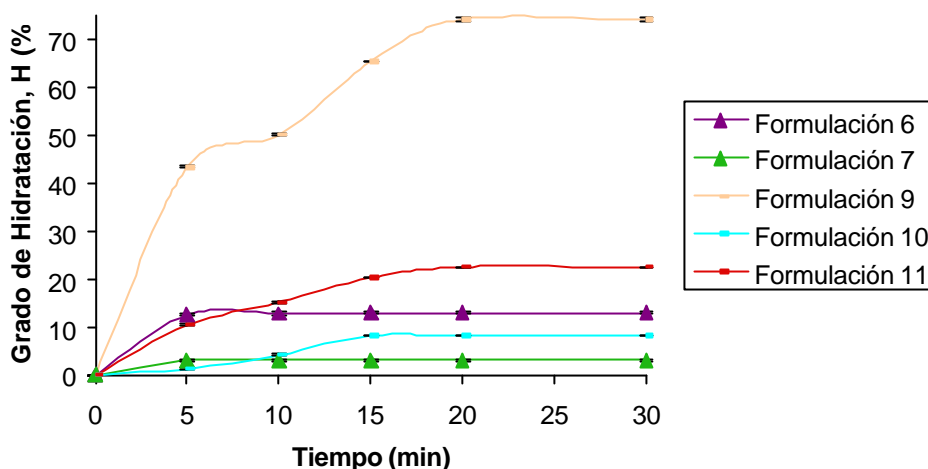


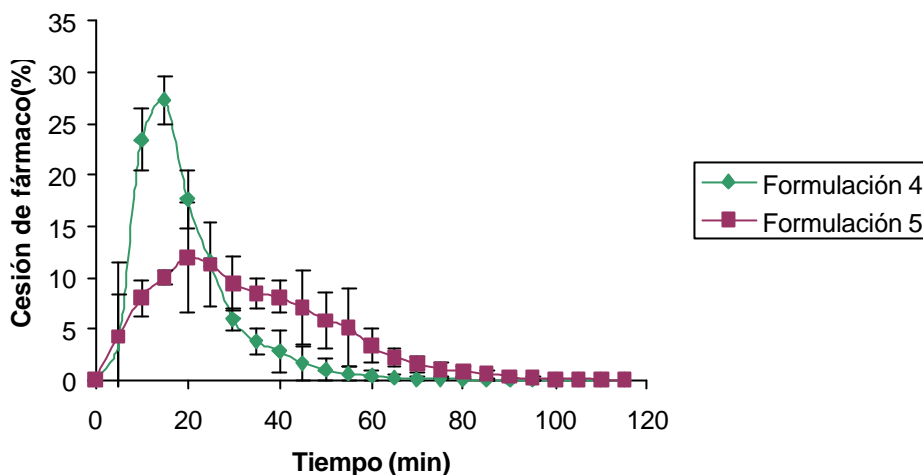
Figura 4. Perfiles de hidratación de las formulaciones 6, 7, 9, 10 y 11.

6b.3.3. CESIÓN DE FÁRMACO

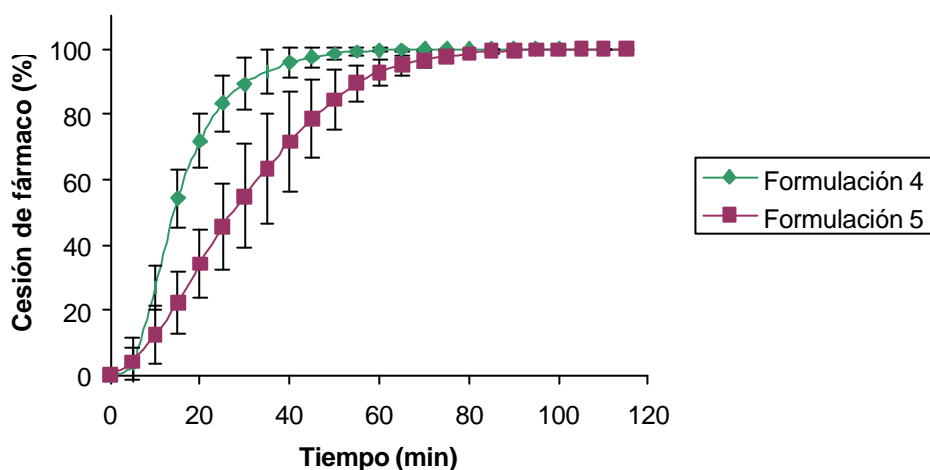
El Ibuprofeno es un fármaco anti-inflamatorio no-esteroideo ampliamente usado caracterizado por su baja solubilidad en agua (Chiarini y col., 1984), (Degim y col., 1998), (Iervolino y col., 2000), (Hadgraft y Valenta, 2000). La sal de lisina del ibuprofeno es más soluble y presenta una mayor biodisponibilidad después de administrarse por vía oral (Martin y col., 1990). En este trabajo estos fármacos se usaron con el objetivo de reducir la respuesta anti-inflamatoria causada en cirugía ortopédica y dental.

El defibrotide tiene propiedades antitrombóticas, anti-isquémicas, anti-inflamatorias y trombolíticas, recientemente ha presentado eficacia en la prevención de trastornos veno-oclusivos después de transplantes de células madre alogénicas (Chalandon et al., 2004). En este trabajo este fármaco se usó con el objetivo de prevenir trastornos veno-oclusivos causados en cirugía dental y ortopédica.

La cesión de IB en la formulación 5 se estudió en comparación a la cesión de IBL en la formulación 4. La Fig. 5a muestra el porcentaje cedido de IBL, IB en cada intervalo de tiempo. La Fig. 5b representa la cesión acumulada de IBL, IB. En estas gráficas es posible observar que el IBL se cedió más rápidamente que el IB; la dosis total se cedió en 50 y 100 minutos desde la formulación 4 y 5 respectivamente. Este hecho es debido a la mayor solubilidad acuosa del IBL, ya que el resto de la formulación fue exactamente igual.



(a)



(b)

Figura 5. Porcentajes de cesión de IBL, IB distributivo (a) y acumulativo (b) desde las formulaciones 4 y 5.

La Fig. 6 presenta la cantidad cedida acumulada de defibrotide desde las formulaciones 8, 9, 10 y 11. El defibrotide cedido desde la formulación 8, que no contiene HPMC, se cedió más rápidamente que en las otras formulaciones. La formulación 9, que contenía 10% de HPMC, cedió la defibrotide muy lentamente (alrededor de 60% en 30 h). La formulación 11 (5% HPMC), que contenía menos hidroxiapatita y más GMS cedió la defibrotide más rápidamente que la formulación 10 (5% HPMC).

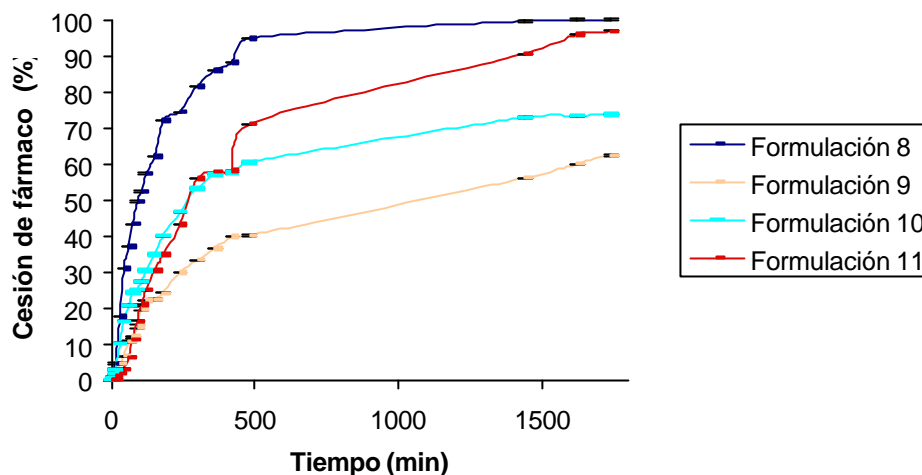


Figura 6. Porcentaje acumulado de cesión de DF desde las formulaciones 8, 9, 10 y 11.

De estos estudios de cesión de fármaco “*in vitro*”, se puede concluir que la pasta base PEG 300/PEG 1500/PEG 10000 (Formulaciones 4 y 5) cedieron el fármaco rápidamente (50-100 min), debido a que los PEGs son solubles en agua. La pasta base PEG 300/PEG 10000/GMS (Formulación 8) cedió el fármaco más lentamente que las formulaciones 4 y 5 (8h), debido a que el GMS es un monoglicérido de ácidos grasos saturados que aumenta la rigidez del material.

6b.4. BIBLIOGRAFÍA

1. Bajpai PK. Ceramic implantable drug delivery system. *Trend Biomat Art Org* 1989;3:50-60.
2. Ben-Nissan B. Natural bioceramics: from coral to bone and beyond. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* 2003;7:283-288.
3. Chalandon Y, Roosnek E, Mermillod B, Newton A, Ozsabin H, Wacker P, Helg C, Chapuis B. Prevention of veno-occlusive disease with defibrotide after allogeneic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation* 2004;10:347-354.
4. Chiarini A, Tartarini A, Fini A. pH solubility relationship and partition coefficients for some anti-inflammatory arylaliphatic acids. *Arch Pharm* 1984;317:268-273.
5. Degim IT, Pugh WJ, Hadgraft J. Skin permeability data: anomalous results. *Int J Pharm* 1998;170:129-133.
6. DeGroot K. In: Vicenzini P, editor. *Ceramics in clinical applications*. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 381.
7. Enneking WF, Mindel ER. Observations on massive retrieved bone allografts. *J Bone Joint Surg* 1991;73:1123-1142.

8. Friedlaender GE, Strong DM, Mankin HJ. Immunology of bone allografts: current knowledge. In: Phillips GO, editor. Bone biology and healing. Singapore: World Scientific, 2003. p. 19-30.
9. Guizzardi S, Raspanti M, Martini D, Scandroglio R, Govoni P, Ruggeri A. Low-temperature heat-deproteinated compact bone to heal large bone defects. *Biomaterials* 1995;16:931-936.
10. Hadgraft J, Valenta C. pH, pK_a and dermal delivery. *Int J Pharm* 2000;200:243-247.
11. Hench LL. In: Ducheyne P, Lemons JE, editors. Bioceramics: materials characteristics vs in vivo behavior. New York: Ann of the New York Academy of Sciences, 1988. p. 54-71.
12. Iervolino M, Raghavan SL, Hadgraft J. Membrane penetration enhancement of ibuprofen using super saturation. *Int J Pharm* 2000;198:229-238.
13. Itoh S, Kikuchi M, Takakuda K, Nagaoka K, Koyama Y, Tanaka J, Shinomiya K. Implantation study of a novel hydroxyapatite/collagen (Hap/col) composite into weight-bearing sites of dogs. *J Biomed Mater Res* 2002;23:3227-3234.
14. Keating JF, McQueen MM. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J Bone Joint Surg* 2001;83(1):3-8.
15. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Novel ceramics for biomedical applications. *J Aust Ceram Soc* 2000;36(1):37-46.
16. LeGeros RZ. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Adv Dent Res* 1988;2:164-80.
17. Martin W, Koselowske G, Toberigh H, Kerkmann T, Mangold B, Augustin J. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ibuprofen after oral administration of ibuprofen lysine in man. *Biopharm Drug Dispos* 1990;11:265-273.
18. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001;71(6):354-361.
19. Murugan R, Panduranga Rao K. Synthesis and characterization of bioactive chitosan bonded bone cement for hard tissue replacement. In: Srinivasan KSV, editor. Proceedings of the IUPAC Macromolecules. New Delhi: Allied Publication, 1998. p. 638-641.
20. Murugan R, Panduranga Rao K. Biodegradable coralline hydroxyapatite composite gel using natural alginate. *Bioceramics* 2002;15:407-410.
21. Murugan R, Panduranga Rao K. Graf polymerization of glycidylmethacrylate onto coralline hydroxyapatite. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003,a;14:457-468.

22. Murugan R, Panduranga Rao K. Grafting of glycidylmethacrylate upon coralline hydroxyapatite in conjugation with demineralized bone matrix using redox initiating system. *Macromol Res* 2003;b;11:14-18.
23. Nakamura H, Asai K, Fujita H, Nakazato H, Nishimura Y, Furuse Y, Sahashi E. The solvent action of sodium hypochlorite on bovine tendon collagen, bovine pulp, and bovine gingiva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60:322-326.
24. Raspanti M, Guizzardi S, De Pasquale V, Martini D, Ruggeri A. Ultrastructure of heat-deproteinated compact bone. *Biomaterials* 1994;15:433-437.
25. Raynaud S, Champion E, Bernache-Assolant D, Thomas P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterization and thermal stability of powders. *Biomaterials* 2002;23:1065-1072.
26. Schiller J, Arnhold J, Arnold K. NMR studies of hypochlorous acid on native pig articular cartilage. *Eur J Biochem* 1995;233:672-676.
27. Tang Z, Kotov NA, Magonov S, Ozturk B. Nanostructured artificial nacre. *Nature Mater* 2003;2(6):413-418.
28. Wang X, Li Y, Wei J, De Groot K. Development of biomimetic nano-hydroxyapatite/poly(hexamethylene adipamide) composites. *Biomaterials* 2002;23:4787-4791.
29. Zhao F, Yin Y, Lu WW, Leong JC, Zhang W, Zhang J, Zhang M, Yao K. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials* 2002;23:3227-3234.

7. CONCLUSIONES

1. Los estudios de DSC de los cementos modificados demuestran que no hay interacción entre los componentes del cemento óseo, el sulfato de gentamicina y los excipientes moduladores de la cesión, lactosa e HPMC, en las proporciones ensayadas, ni antes ni después de ser sometidos a los estudios de cesión *in vitro*.
2. El incremento del porcentaje de fármaco contenido en las formulaciones de cementos óseos modificados (4-8% p/p) no produce un aumento en su cesión.
3. El porcentaje de cesión del sulfato de gentamicina de las formulaciones de cementos óseos modificados es mayor cuando el modulador de la cesión que contienen es lactosa frente a las formulaciones que contienen hidroxipropilmetilcelulosa. Aunque en cualquier caso la alta hidrofobicidad del PMMA impide que se consiga la completa cesión del antibiótico.
4. Las formulaciones de cementos óseos modificados que contienen lactosa en su composición presentan una mayor cesión de antibiótico a medida que se incrementa el porcentaje de lactosa, llegando a ser 4 veces superior a la cesión del cemento comercial en el caso de la formulación que contiene un 20% de lactosa y un 4% de gentamicina.
5. La porosidad de las formulaciones con lactosa antes de los ensayos de disolución disminuye a medida que aumenta el porcentaje de lactosa. Este hecho es probablemente debido al gran tamaño de estas partículas así como a su forma poliédrica, que puede favorecer el empaquetamiento de las mismas lo que da lugar a una menor porosidad. Sin embargo, los datos de porosidad de los cementos sometidos al ensayo de disolución presentan una relación directa entre el aumento del porcentaje de lactosa y el aumento de porosidad, debido a la disolución de este excipiente originando así una mayor cesión del antibiótico.
6. Las formulaciones con HPMC, antes y después de los estudios de disolución, presentan una porosidad superior al resto de las formulaciones. Este hecho se atribuye a que las formulaciones con HPMC presentan una superficie escamosa muy irregular de forma que las grietas que quedan entre estas estructuras escamosas provocan un considerable incremento de la porosidad. Sin embargo, estos valores altos de porosidad no produjeron un aumento en la cesión de sulfato de gentamicina, que fue similar a la cesión del cemento comercial.

7. Los valores de resistencia tracción tanto en los cementos comerciales como en los modificados son siempre inferiores a la resistencia a la tracción del hueso, garantizándose así el fallo del cemento antes que del hueso. Los nuevos cementos presentan una menor resistencia a la tracción que los comerciales (80-63%) y esta diferencia es más acusada cuando se incluye lactosa en su composición.
8. Las nuevas formulaciones de cementos presentan una tenacidad de fractura semejante a los cementos comerciales tanto antes como después de los ensayos de cesión.
9. Todos los cementos exhiben cierta plastificación tras haber estado en contacto con el medio de disolución.
10. El cemento modificado que produce una mayor cesión del antibiótico y que contiene un 20% de lactosa y un 4% de gentamicina presenta unas propiedades mecánicas aceptables para su uso en cirugía ortopédica.
11. En todos los cementos el porcentaje de monómero residual disminuye a medida que aumenta el tiempo de polimerización existiendo pequeñas diferencias entre el porcentaje de monómero residual que presentan los cementos comerciales frente a los modificados.
12. Todos los cementos tanto comerciales como modificados son citotóxicos en líneas celulares de macrófagos siempre y cuando todo el monómero residual se ceda al medio celular.
13. Los comprimidos matriciales de poli (D, L-láctico-co-glicólico) PLGA 50:50 presentan una rápida cesión inicial del sulfato de gentamicina siendo menor cuando contienen un 10% de fármaco. Durante las primeras 24 horas los comprimidos de implantación originan elevadas concentraciones locales de gentamicina (430 $\mu\text{g/ml}$ - 480 $\mu\text{g/ml}$) no citotóxicas a este nivel local.
14. Se elaboran microesferas de poli (D, L-láctico-co-glicólico) PLGA 50:50 por el método de doble emulsión con evaporación de solvente utilizando una sonda de ultrasonidos o un agitador de alta velocidad para hacer la primer emulsión. El primer método presenta varias ventajas frente al segundo método. Estas ventajas son:
 - Las microesferas presentan una distribución de tamaño más homogénea.
 - La eficacia de encapsulación del sulfato de gentamicina aumenta hasta seis veces.

- Se mejora el comportamiento de cesión del sulfato de gentamicina. El 60% de la gentamicina encapsulada se cede lentamente, factor clave para la prevención y el tratamiento de la osteomielitis.
15. Entre las distintas pastas hidrofílicas de hidroxiapatitas de implantación odontológica para liberación local controlada de fármacos, la formulación que presenta mejores resultados de hinchamiento y cesión *in vitro* es la formulación 8 que contiene 43% de hidroxiapatita, 7% de PEG 300, 14% PEG 10.000 y 21% de gliceril monoestearato.