

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos

Obtención de microesferas biodegradables de ácido poli L-láctico cargadas con doxorubicina

Danielis Fernández Mena,¹ Martha Gómez Carril,² Diana Ramos Picos,³ Nicté González Alfonso,⁴ Leopoldo Núñez de la Fuente⁵ y Noelio Flores Díaz⁶

La doxorubicina es un fármaco antineoplásico, de la categoría de los antibióticos, de gran espectro y utilidad en el tratamiento de una amplia variedad de neoplasias humanas, incluso en diversos tumores sólidos. Su utilidad clínica está limitada debido a su cardiotoxicidad la que está relacionada con la dosis total del fármaco administrado.

Estos agentes antineoplásicos generalmente dañan tanto las células tumorales como las normales causando efectos colaterales indeseables, por lo que se hace necesario buscar soluciones relacionadas con la reducción de las concentraciones sistémicas del fármaco o incrementar su concentración en el sitio de acción para lograr la actividad farmacológica máxima con un mínimo de estos efectos. Por este motivo se le ha brindado gran atención a los sistemas de entrega de fármacos por lo que resulta de gran utilidad las microesferas biodegradables del ácido poli (L-láctico) que proporcionan una liberación controlada y mantenida del fármaco, lo cual contribuye a disminuir los efectos adversos.¹

Este trabajo se propuso como objetivo evaluar la influencia de algunos parámetros en el proceso de obtención de microesferas biodegradables preparadas a partir de polímeros del ácido láctico cargadas con doxorubicina.

Métodos

Se empleó doxorubicina de la firma Distriquim, ácido poli L-láctico (PLA); Resomer L-207 y L-209 de la Boehringer Ingelheim, alcohol polivinílico (APV) con PM 14000 de la BDH, cloruro de sodio y diclorometano (DCLM) de la Riedel de Haën.

Se utilizó un homogeneizador Polytron PT 3100 para la formación de las emulsiones, un agitador IKA WERK RW 20 D2M para la evaporación del solvente, una centrífuga Janestki para su recolección, un rotoviscosímetro Haake con sistema M5/NV para la determinación de la viscosidad de la fase oleosa y un cromatógrafo líquido de alta resolución KNAUER para la cuantificación del principio activo.

Preparación de las microesferas

La obtención de las microesferas se realizó por el método de emulsión múltiple agua en aceite en agua (W1/O/W2) y evaporación del solvente.²⁻⁴

La doxorubicina se disolvió en una cantidad de agua purificada previamente establecida (fase acuosa interna), y se incorporó a la fase oleosa compuesta por el PLA L-207 y L-209 disuelto en diclorometano homogeneizado hasta obtener la primera emulsión W1/O. Esta se adicionó lentamente sobre un medio acuoso (fase acuosa externa) que contiene alcohol polivinílico y cloruro de sodio formándose la emulsión W1/O/W2.

Las microesferas fueron colectadas por centrifugación y posterior filtración, lavándose varias veces con agua purificada y secadas en ambiente desecante.

Condiciones para la evaporación del solvente

El solvente orgánico empleado (diclorometano) se puede acumular en el local de trabajo saturando el ambiente y por tanto, afectando la evaporación de este y la formación de las microesferas, por lo que se realizaron ensayos modificando las condiciones ambientales como la temperatura del local y la extracción parcial o total del aire que circula y se evaluó su influencia en el proceso tecnológico.

Efecto del alcohol polivinílico, cloruro de sodio y temperatura de la fase acuosa externa en las características de las microesferas

Se realizó un diseño factorial 2² variando las concentraciones de alcohol polivinílico y cloruro de sodio en la fase acuosa externa, y se determinó su influencia en la eficiencia de encapsulación, en la distribución del tamaño de partícula (diámetro medio) y en el rendimiento. Se procesaron los datos estadísticamente para definir las variables significativas (tabla 1).

Una vez definidas las concentraciones de alcohol polivinílico y cloruro de sodio, se obtuvieron microesferas modificando la temperatura de la fase acuosa externa a 10 ± 2 °C con lo que se esperaba mejorar la estabilidad de la emulsión y lograr una buena encapsulación. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado para comprobar su reproducibilidad.⁴⁻⁶

Efecto de la viscosidad de la fase oleosa en el método de obtención de las microesferas

Para evaluar la influencia de la viscosidad de la fase oleosa en la obtención de las microesferas se utilizaron 2 polímeros de diferentes viscosidades intrínsecas manteniendo constante todas las variables del proceso. Se determinó la viscosidad aparente de las soluciones de ambos polímeros y se obtuvieron microesferas por el método descrito anteriormente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se realizaron algunas modificaciones en la fase orgánica con el objetivo de lograr con el polímero PLA L-207 soluciones de igual viscosidad aparente que la obtenida en la solución del polímero PLA L-209.

Para ello se emplearon 2 variantes con respecto a las condiciones iniciales: incremento de la concentración de polímero, manteniendo constante el volumen de DCLM, y manteniendo constante la concentración del polímero, disminuyendo el volumen de DCLM.

Tamaño de partícula

Se determinó en un analizador de tamaño de partícula por dispersión de láser (Coulter LS Particle Size Analyser), modelo LS 230 con módulo de pequeños volúmenes para suspensión, utilizando un modelo óptico de Fraunhofer. El tiempo de corrida fue de 60 s, utilizando agua como fluido; se obtuvo la gráfica del porcentaje de partícula en número, en función del diámetro de esas partículas en micrómetros, y se promediaron 3 mediciones^{6,7}

Rendimiento

Para la determinación del rendimiento se pesaron el total de microesferas obtenidas y al conocer la cantidad exacta de principio activo y de polímero empleado se aplicó la ecuación siguiente:

$$R (\% \text{ m/m}) = \frac{m_{\text{total me}}}{m_{\text{pa}} + m_{\text{PLA}}} \cdot 100$$

donde:

R: rendimiento.

m: masa.

me: microesferas.

pa: principio activo.

PLA: ácido poli -Láctico.

Eficiencia de encapsulación

Se pesaron 40 mg de microesferas cargadas con doxorubicina y se disolvieron en una solución metanol/DCLM completándose a volumen de 100 mL.

Se preparó una solución de doxorubicina SR en metanol/DCLM a una concentración de 20 µg/mL.

Las condiciones cromatográficas son similares a las de la USP 238 para determinar doxorubicina materia prima.

Se calculó la eficiencia de encapsulación según la ecuación siguiente:

$$EE (\% \text{ m/m}) = \frac{C_1}{C_2} \cdot 100$$

donde:

EE: eficiencia de encapsulación.

C1: concentración real de doxorubicina en las microesferas.

C2: concentración teórica de doxorubicina en las microesferas.

Resultados

Las condiciones ambientales óptimas para la obtención de las microesferas se lograron con la temperatura del local de 24 ± 2 °C y extracción total del aire que circulaba.

En la tabla 1 se muestran los resultados del análisis físico-químico de las microesferas obtenidas por el diseño 2^2 .

TABLA 1. Influencia de la concentración de alcohol polivinílico y del cloruro de sodio

No. de ensayos	Diámetro medio (μm)	Eficiencia de encapsulación (%)	Rendimiento (%)
1	1,95	41,89	43,23
2	1,32	61,97	51,13
3	0,925	69,4	64,97
4	0,875	75,71	71,39

En la tabla 2 se presentan los resultados de los ensayos realizados para evaluar la influencia de la temperatura de la fase acuosa externa.

TABLA 2. Influencia de la temperatura de la fase acuosa externa en el proceso

Ensayos	Temperatura (°C)	Eficiencia de encapsulación (%)	Rendimiento (%)	Diámetro medio (µm)
1	24 ± 2	75,7	65,5	0,875
2	10 ± 2	80,3	73,9	0,767

En las tablas 3 y 4 se observan los resultados del estudio de la influencia de la viscosidad aparente e intrínseca de la fase orgánica en las características físico-químicas de las microesferas.

TABLA 3. Influencia de la viscosidad de la fase orgánica en las características de las microesferas

PLA	η intrínseca (dL/g)	η aparente (mPa.s)	Eficiencia de encapsulación (%)	Rendimiento (%)	Diámetro medio (µm)
L - 207	1,6	70,08	61,6	86,83	0,843
L - 209	3	245,9	80,3	72,48	0,767

TABLA 4. Influencia de la fase orgánica en las características de las microesferas

PLA L - 207	PLA: DCLM (g: mL)	aparente (mPa.s)	Eficiencia de encapsulación (%)	Rendimiento (%)	Diámetro medio (µm)
1	2,1:15	244,8	-	-	-
2	1,5:10.7	246,3	85,2	79,08	0,698

Las curvas de distribución del porcentaje de partículas en número, en función del diámetro de las microesferas en micrómetros, se muestran en la figura, para los 2 polímeros estudiados.

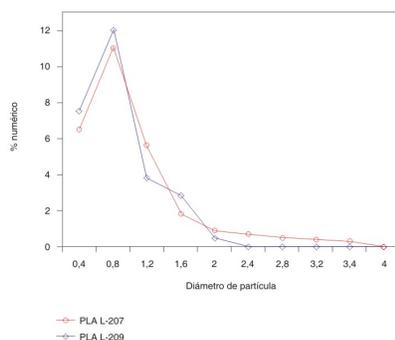


Fig. Curvas de distribución de las microesferas obtenidas con PLA L-207 y PLA L- 209.

Discusión

Las condiciones de trabajo del local para la obtención de las microesferas deben ser controladas para lograr micropartículas con las propiedades físico-químicas adecuadas en un tiempo de producción lógico. Con las variantes ensayadas se puede comprobar que al trabajar a una temperatura de 30 C aproximadamente con extracción parcial o total, no se logran buenos resultados ya sea por acumulación del solvente o por una evaporación muy rápida que provoca la agregación de las partículas.

Sin embargo, cuando se trabaja a temperatura controlada: 24 ± 2 C se logra mejorar la eficiencia de encapsulación y se obtienen mejores resultados al realizar la extracción total del solvente.

El análisis estadístico para evaluar el efecto del alcohol polivinílico y el cloruro de sodio en el procedimiento de obtención de las microesferas mostró, como puede ser observado en la tabla 1, que la combinación de ambas sustancias es necesaria para lograr una buena eficiencia de encapsulación y un mejor rendimiento.

Los resultados de la tabla 2 demuestran que al disminuir la temperatura a 10 ± 2 C se logran mejores resultados en los parámetros estudiados.

En la tabla 3 se puede apreciar que con el polímero de menor viscosidad intrínseca y aparente se obtiene una eficiencia de encapsulación inferior, aunque el tamaño promedio de las partículas no presentó diferencias significativas. Sin embargo, cuando se prepararon soluciones de polímero de menor viscosidad intrínseca para iguales viscosidades aparentes, variando la relación polímero-solvente orgánico, se encontró que al aumentar el PLA, manteniendo invariable el solvente orgánico, se aglomeraban las microesferas y por tanto, se afectaba la formación de estas, no ocurriendo así cuando se disminuyó el solvente orgánico y permaneció invariable el PLA, caso en que se obtenían buenos resultados de eficiencia de encapsulación, rendimiento y diámetro medio de las partículas (tabla 4).

El análisis de la distribución del tamaño de las partículas, por dispersión de láser, de los ensayos realizados con los polímeros L-209 y L-207 a igual viscosidad aparente, demostró que no existen diferencias significativas entre ambos.

En la figura se muestran las curvas de distribución presentando en los 2 casos asimetría hacia la derecha y distribución leptokúrtica.

Los resultados obtenidos permitieron llegar a la conclusión de que las condiciones ambientales, así como las diferentes variantes y el tipo de polímero estudiadas influyen en las características de las microesferas, por lo que se puede establecer un procedimiento tecnológico adecuado para su obtención en nuestras condiciones de trabajo.

Referencias Bibliográficas

1. Ike O, Shimizu Y, Ikada Y, Watanabe S, Natsume T. Biodegradation and antitumor effect of adriamycin-containing poly (L-lactic acid) microspheres. Tokio: Research Centre for Biomedical Engineering and Chest Disease Research Institute; 1990. p. 757-62.
2. Soma CE, Dubernet C, Barrat G, Nemati F, Appel M, Benita S, et al. Ability of doxorubicin - loaded nanoparticle to overcome multidrug resistance of tumor cells after their capture by macrophages. Pharm Res. 1999;16(11):1710-6.
3. Okada H, Doken Y, Ogawa Y and Toguachi H. Preparation of three month depot injectable microspheres of Leuprorelin Acetate using biodegradable polymers. Pharm Res. 1994;11 (8):1143-7.
4. Benite S, Benoit JP, Puisieux F, Thies C. Characterization of drug loaded poly (d,l-lactide) microspheres". J Pharm Sci. 1994;732(2):1721-8.
5. Görner T, Gref R, Michenot F, Sommer D, Tran MNE, Dellacherie MN. Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix. J Control Release. 1999;57:259-68.
6. Lamprecht A, Schafer UF, Lehr CM. Characterization of microspheres by confocal laser scanning microscopical structure, capsule wall composition and encapsulation rate. Eur J Pharm Biopharm. 2000;49 (1):1-9.
7. Giunchedi P, Conte U, Chetoni P, Saettone MF. Pectic microspheres as ophthalmic carriers for piroxicam evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits. Eur J Pharm Sci. 1999;9:1-7.
8. The United States Pharmacopeia. 23 ed. Rockville: Convention; 1995. p. 478.

Recibido: 3 de enero de 2005. Aprobado: 31 de enero de 2005.

Lic. *Dianelis Fernández Mena*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Calle 19 de Mayo No.13 esq. a Amézaga, Plaza de la Revolución, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba.

¹Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a Investigadora.

²Master en Ciencias Tecnología y Control de los Medicamentos. Investigadora Auxiliar.

³Master en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a investigadora.

⁴Master en Ciencias, Tecnología y Control de Medicamentos. Aspirante a Investigadora.

⁵Master en Técnicas. Investigador Agregado.

⁶Doctor en Ciencias Técnicas. Investigador Auxiliar.