

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E. A. P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Elaboración y caracterización de micropartículas
parenterales por el método A1/O/A2 - evaporación del
solvente optimizado:**

biopolímeros útiles, factores tecnológicos y de formulación y su
aplicación en un fármaco hidrosoluble

TESIS

para optar al título profesional de Químico Farmacéutica

AUTOR

Liliana Bautista Chávez

ASESOR

Gustavo Vladimir Bravo Orellana

Lima-Perú

2009

Dedicatoria:

A mis queridos padres, por su amor
y apoyo incondicional, para que siempre sientan
como propios cada uno de mis logros conseguidos.

INDICE

RESUMEN

SUMMARY

I.- INTRODUCCIÓN.....	Pág.	1-2
II.- GENERALIDADES		
II.1. Sistema de liberación controlada de fármacos.....	Pág.	3-4
II.1.1 Mecanismos de funcionamiento de los sistemas de liberación controlada	Pág.	5
II.2. Microencapsulación.....	Pág.	7
II.2.1 Usos y aplicación de la microencapsulación	Pág.	7
II.2.2. Micropartículas.....	Pág.	8
II.3. Polímeros empleados en la elaboración de micropartículas parenterales	Pág.	9
II.3.1. Polimerización	Pág.	9
II.3.2. Polímeros Biodegradables	Pág.	9
II.3.2.1. Acido poliláctico.....	Pág.	9
II.3.2.2. Acido poliglicólico.....	Pág.	10
II.3.2.3. Acido policaprolactona.....	Pág.	11
II.3.2.4. Copolímeros.....	Pág.	11
II.3.2.5. Poliortoésteres.....	Pág.	11
II.3.2.6. Características fisicoquímicas.....	Pág.	12
II.4. Mecanismos de bioerosión.....	Pág.	12
II.5. Mecanismos de liberación.....	Pág.	13
II.6. Características de los sistemas bioerosionables....	Pág.	14
II.7. Métodos de obtención de las micropartículas.....	Pág.	14
III.- PARTE EXPERIMENTAL	Pág.	16-36
IV.- RESULTADOS	Pág.	37-49
V.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	Pág.	50
VI.- CONCLUSIONES.....	Pág.	51-52
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Pág.	53-56
VIII.- ANEXOS.....	Pág.	57

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó si los Biopolímeros son válidos para obtener micropartículas por el método de la doble emulsión (A₁/O/A₂)- evaporación del solvente, método específico para la microencapsulación de fármacos hidrosolubles. La capacidad de cada uno de ellos para obtener micropartículas se evalúa a través del aspecto de las micropartículas (MP) y del rendimiento del proceso. Se realizó una optimización del método empleado en la elaboración de las MP, evaluando la posible influencia de factores tecnológicos y de formulación en el aspecto y tamaño de las MP. Con el método optimizado se elaboran micropartículas biodegradables conteniendo un fármaco hidrosoluble, capaces de controlar la liberación de fármaco durante al menos una semana y que se puedan administrar por vía parenteral mediante inyección subcutánea.

Las micropartículas obtenidas fueron caracterizadas mediante la determinación del aspecto y tamaño, rendimiento del proceso, cantidad de fármaco encapsulado (carga) y ensayo de cesión in vitro. En general, con todos los Biopolímeros empleados se pueden obtener MP. El aspecto y rendimiento del proceso de encapsulación varía según el material polimérico empleado. La concentración de tensioactivo en la fase externa acuosa y el proceso de extracción-evaporación del solvente influyen de forma significativa en el aspecto de las MP obtenidas. Todas las MP presentaron un tamaño adecuado para su administración parenteral. Con 3 polímeros de los 7 estudiados se logra obtener MP con una carga adecuada para una administración cómoda de una dosis semanal de fármaco hidrosoluble.

Palabras clave: micropartículas, biopolímeros, método A₁/O/A₂ – evaporación del solvente, factores tecnológicos, parenteral, liberación controlada, fármacos hidrosolubles.

SUMMARY

The present study evaluated whether Biopolymers are valid for microparticles by double emulsion method (A₁/O/A₂) - evaporation of the solvent, specific methods for the microencapsulation of water-soluble drugs. The ability of each to obtain microparticles were evaluated through the appearance of microparticles (MP) and efficiency of the process. We performed an optimization of the method used in the development of MP, assessing the possible influence of formulation and technological factors in the appearance and size of the MP. With the optimized method developed biodegradable microparticles containing a water-soluble drug, capable of controlling the release of drug for at least a week and can be administered via parenteral injection.

The microparticles obtained were characterized by determining the appearance and size, processor performance, amount of drug encapsulation (load) and transfer in vitro test. In general, all employees can get Biopolymers MP. The appearance and performance of the process of encapsulation varies with the polymer used. The concentration of surfactant in the external aqueous phase and the process of extraction-evaporation of the solvent significantly affect the appearance of MP obtained. All MP presented a size suitable for parenteral administration. With 3 of the polymers were studied 7 MP to obtain a load suitable for a comfortable administration of a weekly dose of water-soluble drug.

Key words: microparticles, biopolymers, method A₁/O/A₂ - evaporation of the solvent, technological factors, parenteral controlled release, water-soluble drugs.

I. INTRODUCCIÓN

Los sistemas que controlan la liberación de fármacos, entre los que destacan las micropartículas (MP), han tenido un gran desarrollo en los últimos años. Sistemas de liberación controlada muy interesantes para garantizar la eficacia, seguridad y estabilidad de nuevas moléculas, de gran potencial terapéutico, como oligopéptidos, proteínas, que la biotecnología está poniendo a disposición de la terapéutica, pero que debido a sus características biofarmacéuticas y/o estabilidad in vivo su aplicación en terapéutica está muy limitada.

Las micropartículas (MP) son sistemas coloidales con un tamaño de partícula comprendido entre 1 y 1000 μm . Existen numerosas técnicas para su elaboración. El método de la doble emulsión ($A_1/O/A_2$) – evaporación del solvente es el de elección cuando se busca la microencapsulación de principios activos hidrosolubles. En el presente trabajo decidimos utilizar este método porque empleamos un fármaco hidrosoluble como modelo a encapsular. ⁽¹⁾⁽²⁾

Los polímeros se emplean como materiales transportadores o controladores de la liberación de fármacos cuando se elaboran micropartículas (MP). Deben ser biocompatibles y en el caso de las micropartículas parenterales, también biodegradables. Materiales con ambas características se obtienen del ácido láctico (PLA), ácido glicólico (PGA), caprolactona (PCL) y de sus copolímeros. Cada uno de estos materiales transportadores presenta distintas características (peso molecular, grado de cristalinidad, velocidad de degradación, temperatura de fusión, solubilidad...), pero no siempre son válidos para obtener MP. Por tanto, la adecuada selección de este material controlador es de gran importancia. Todas estas propiedades físico-químicas de los polímeros influyen en la elaboración de las micropartículas, en su estructura, relación principio activo-polímero y en el proceso de liberación del fármaco. Los factores tecnológicos y

de formulación pueden incidir de forma significativa en el aspecto de las micropartículas obtenidas por el método de la doble emulsión (A₁/O/A₂)-evaporación del solvente. El aspecto de las micropartículas es muy importante, ya que está relacionado con el control de la liberación de fármaco que transportan, con la posibilidad de ser fagocitadas o no por los macrófagos una vez administradas.

Los **objetivos** de la presente investigación fueron:

- Determinar si los biopolímeros biocompatibles y biodegradables son válidos para obtener micropartículas parenterales por el método de la doble emulsión (A₁/O/A₂)-evaporación del solvente.
- Optimizar un método para la elaboración de micropartículas biodegradables conteniendo un fármaco hidrosoluble, evaluando la posible influencia de factores tecnológicos y de formulación en el aspecto y tamaño de las micropartículas.

Los **objetivos específicos** de este trabajo fueron:

- Caracterizar las micropartículas obtenidas en: Tamaño, morfología, carga y cesión de fármaco estableciendo parámetros de comparación con cada uno de los polímeros biocompatibles y biodegradables utilizados en su elaboración. Por ello se emplea un fármaco hidrosoluble como modelo a encapsular.
- Optimizar un método por espectrofotometría capaz de analizar el fármaco hidrosoluble en presencia del material transportador polimérico, útil en la determinación de la carga y la cantidad de fármaco liberado de las micropartículas.

II. GENERALIDADES:

II.1 Sistemas de liberación controlada de fármacos

La liberación de un fármaco es el proceso mediante el cuál el principio activo presente llega a estar disponible para su absorción. Las formas tradicionales de administración de medicamentos presentan el inconveniente de que producen una gran variación de los niveles del principio activo en la sangre a lo largo del tiempo. ⁽³⁾

En la siguiente figura, para cada fármaco se puede definir tres niveles, de acuerdo a su concentración en plasma: el nivel inefectivo, el terapéutico y el tóxico. Lo ideal sería que el nivel terapéutico fuera muy amplio de forma que difícilmente se llegara al nivel tóxico.

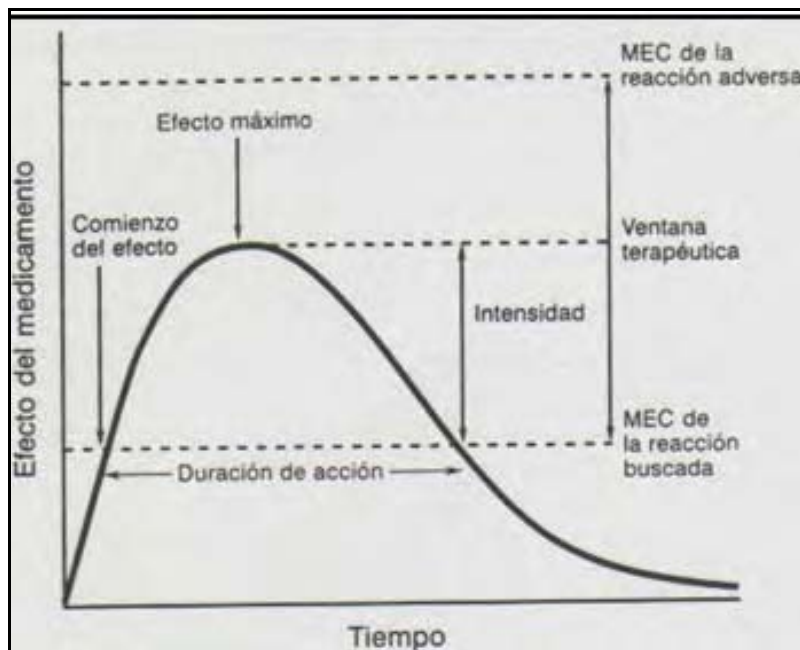


Figura 1. Niveles en sangre alcanzados por un fármaco.

Las fórmulas de liberación controlada se han diseñado con el fin de reducir la frecuencia de administración y las fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas y, de esta forma, conseguir un efecto farmacológico uniforme. Además, la menor frecuencia de administración es más cómoda para el paciente y puede mejorar el

cumplimiento de la prescripción. **En principio, los fármacos apropiados para este tipo de formas farmacéuticas son los que requieren una dosificación frecuente debido a su corta semivida de eliminación.** ⁽³⁾

Los sistemas de liberación de fármacos consistentes de polímeros biodegradables permiten controlar la liberación de fármacos efectivamente dentro del rango terapéutico deseado, evitando las consecuencias de un exceso o un déficit, que podrían comprometer su eficacia antes de la administración de la siguiente dosis. ⁽¹⁾

Ventajas de los sistemas de liberación controlada para vía parenteral: ⁽¹⁾

- Complacencia para el paciente, pues con una sola dosificación se logra un efecto terapéutico prolongado.
- El sistema proporciona el grado de control necesario para lograr un orden de liberación del principio activo cercano a cero.
- La velocidad y duración de la liberación del principio activo *in vivo* pueden ser determinadas mediante la selección del tamaño de las partículas.
- Las partículas son lo suficientemente pequeñas para ser administradas por medio de una inyección y se biodegradan en el organismo sin causar ningún efecto indeseable en el sitio de inyección o implantación.
- Se evita el efecto del primer paso.
- Estabilidad física, química y microbiológica.
- Se reducen las concentraciones sistémicas de la droga y se promueve la concentración local en el órgano blanco, de manera que se obtiene la máxima actividad farmacológica con mínimos efectos adversos sistémicos.

- Protección del principio activo frente a posibles inactivadores en el medio biológico antes de alcanzar el lugar de acción.
- Fácil fabricación con buena reproductibilidad.

II.1.1 Mecanismos de funcionamiento de los sistemas de liberación controlada

Los dispositivos para la liberación controlada de fármacos pueden ser clasificados en tres tipos dependiendo de cuál sea el principio fisicoquímico de su funcionamiento: ⁽³⁾

- 1.-Dispositivos de control por difusión.
- 2.-Dispositivos de control por disolvente.
- 3.-Dispositivos de control químico.

1.-Dispositivos de control por difusión.- como indica su nombre, en estos dispositivos el mecanismo por el que el principio activo sale del dispositivo y se libera al organismo es la difusión. La difusión es un proceso físico que tiene lugar cuando se ponen en contacto dos sistemas que tienen diferente concentración de una sustancia. Cuando esto ocurre, existe un transporte de dicha sustancia desde el sistema más concentrado al menos concentrado hasta que la concentración se iguala. Las leyes de difusión de Fick, nos permite conocer cómo es el flujo de la sustancia. Si atendemos a su composición veremos que en estos dispositivos existen dos componentes fundamentales: el principio activo y un polímero y de acuerdo a su diseño y mecanismo de acción se suelen dividir en dos grupos los dispositivos monolíticos o de tipo matriz y los dispositivos de depósito.

- **Dispositivos monolíticos o de tipo matriz:** En este caso el fármaco se encuentra íntimamente mezclado (disuelto o disperso) con el polímero, el proceso de liberación se produce por difusión. La velocidad de liberación del principio activo en los dispositivos de tipo monolítico no sigue una cinética de

orden cero, es decir, no es constante. Al principio la liberación es más rápida y por esta razón se emplean para la fabricación de sistemas de bajo costo en los que no es preciso controlar demasiado la velocidad de liberación.

- **Dispositivos de depósito:** En estos casos el principio activo está contenido dentro de una capa de polímero que controla la velocidad de salida.

2.- Dispositivos controlados por el solvente.- liberan el principio activo como consecuencia de la entrada de disolvente en su interior. Podemos distinguir dos mecanismos: control osmótico y control por hinchamiento. ⁽³⁾

- **Control osmótico:** la presión osmótica puede ser utilizada, en muchos casos como fuerza impulsora del agente desde el dispositivo al interior del organismo. Estos dispositivos tienen propiedades muy interesantes: son genéricos y operan independientemente del tipo agente activo, pueden liberar macromoléculas, se consigue una liberación constante del fármaco, con mayor facilidad que en el caso de los de control difusional.
- **Control por hinchamiento:** estos sistemas están formados por un xerogel que contiene en su interior un fármaco, la estructura rígida inmoviliza e impide la difusión del principio activo. Cuando este gel se introduce en una disolución acuosa, el agua penetra en su estructura produciendo la relajación de sus cadenas y, como consecuencia de este proceso, el fármaco comienza a difundir.

3.- Dispositivos controlados químicamente.- en este caso hablamos del uso de **polímeros biodegradables**, polímeros que se puedan degradar química o enzimáticamente en la cadena metabólica, produciendo metabolitos inertes para el organismo. Presenta dos tipos:

- **Los dispositivos bioerosionables**, que presentan la ventaja de que no es necesario quitarlos una vez que han cumplido su función pues son reabsorbidos por el organismo.
- **Los dispositivos en los que el principio activo está covalentemente unido a la cadena polimérica** a través de un enlace lábil que puede romperse por hidrólisis o enzimáticamente.

II.2 Microencapsulación

La microencapsulación de medicamentos, desde el punto de vista tecnológico, es el proceso de recubrimiento de medicamentos, bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. El producto resultante de este proceso tecnológico recibe la denominación de **“micropartículas”, “microcápsulas” o “microesferas”**, sistemas que se diferencian en su morfología y estructura interna. La característica común de estos sistemas es su tamaño, el cual es siempre inferior a 1mm.

Si poseen un tamaño inferior a 1 μm , el producto resultante del proceso de microencapsulación recibe el nombre de **“nanoesfera” o “nanopartículas”**.⁽⁴⁾

II.2.1 Usos y aplicaciones de la microencapsulación

- Microencapsulación de diversos medicamentos, para enmascarar el sabor.
- Formación de nanopartículas para proteger sustancias activas de aplicación en cosmética, farmacia, industria alimentaria por diversos métodos.
- Microencapsulación de insulina para uso oral, para evitar la degradación de la insulina por las enzimas gastrointestinales.
- Microencapsulación de aceites esenciales, pigmentos.

- Microencapsulación de vitamina E.
- Microencapsulación de enzimas para comprobar como afecta a su actividad.
- Microencapsulación aplicada a la industria textil.

Un hecho destacable en el proceso de microencapsulación radica en que su aplicación y usos no se limitan únicamente al campo de los medicamentos, sino que se extiende a campos tan diversos como la cosmética, la alimentación.

II.2.2 Micropartículas.- Las micropartículas (MP) son sistemas coloidales con un tamaño de partícula comprendido entre 1 y 1000 μm .⁽⁵⁾

Se han de tener presentes una serie de consideraciones farmacéuticas en el desarrollo de estos sistemas de liberación controlada: 1) Tipo de material, 2) ruta de preparación, 3) tamaño de las micropartículas, 4) cantidad de fármaco incorporado, 5) carga, 6) fármaco liberado, 9) efecto del almacenamiento, 10) propiedades de la superficie, 11) antigenicidad, 13) biofase y toxicidad del sistema de liberación, y 14) fármaco y biocinética del sistema de liberación.⁽⁶⁾

La figura 2, muestra una foto (SEM) de las MP obtenidas en el presente trabajo.

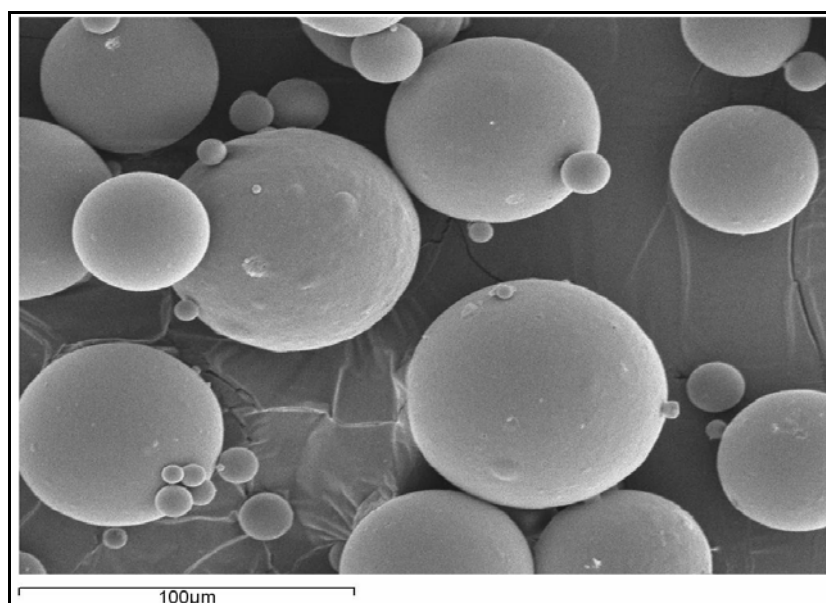


Figura 2. Foto (SEM) de MP elaboradas con D, L – PLA (R207S)

II.3. Polímeros empleados en la elaboración de micropartículas parenterales: ⁽²⁾

Los polímeros son estructuras macromoleculares en las que se diferencian una o varias unidades estructurales, llamados monómeros, que se repiten originando cadenas.

Si el polímero proviene de un único tipo de monómero se denomina homopolímero por ejemplo: El ácido poliláctico (PLA), poliglicólico (PGA), la policaprolactona (PCL).

Y si proviene de 2 monómeros diferentes se llama copolímero, así tenemos a los copolímeros: Poliláctico-glicólico (PLGA), Poliláctico-policaprolactona (PLA-PCL).

Los terpolímeros, están compuestos por 3 monómeros diferentes.

Los polímeros pueden ser:

- Naturales.
- Semisintéticos o sintéticos.
- Hidrófilos o hidrófobos.
- Biodegradables o no.

II.3.1 Polimerización.- es la reacción por la cual se sintetiza un polímero a partir de sus monómeros. ⁽²⁾

II.3.2 Polímeros Biodegradables: ⁽²⁾

Destacan los ácidos polilácticos (PLA), ácidos poliglicólicos (PGA), la policaprolactona (PCL), y sus copolímeros (PLGA) y (PLA- PCL), los poliortoésteres y los polianhídridos.

II.3.2.1 El ácido poliláctico (PLA): El homopolímero Poliláctico (PLA) es un poliéster alifático, es un polímero termoplástico, amorfo o semicristalino, biodegradable,

hidrófobo, de origen sintético. Se sintetiza a partir del ácido láctico mediante polimerización por apertura de anillo del dímero cíclico del ácido láctico. El ácido láctico presenta 2 isómeros: L – PLA y D, L- PLA. Su forma L-láctico (L-PLA), presenta un alto grado de cristalinidad (37%) debido a su estereoregularidad, presenta un elevado punto de fusión (175-178°C) y una temperatura de transición vítrea de 60-65°C. Su forma D, L-poliláctico, es un polímero amorfo ya que está constituido por las dos formas isoméricas (D y L) del ácido láctico, presenta una velocidad de degradación mucho mayor que la forma L- PLA. Debido a que el ácido láctico es un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos en nuestro organismo, el uso de este poliéster es generalmente visto como la situación ideal desde el punto de vista toxicológico, se degrada inicialmente por hidrólisis y su degradación conlleva a la liberación de ácido láctico, este ácido es incorporado dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación y da inicio a la ruta metabólica.

II.3.2.2 El ácido poliglicólico (PGA): es el poliéster alifático lineal más simple, biodegradable, hidrófobo, de origen sintético. Este homopolímero se obtiene mediante un proceso de dimerización del ácido glicólico, se sintetiza el monómero, el cual por polimerización de apertura de anillo produce un material de elevado peso molecular, este polímero presenta una elevada cristalinidad (45-55%), un alto punto de fusión (220-225°C) y una temperatura de transición vítrea de 35-40°C.

Al igual que el ácido poliláctico, este homopolímero se degrada en el organismo dando una sustancia no tóxica que es metabolizada por nuestro organismo.

La biodegradación del ácido poliláctico (PLA) de estructura semicristalina es de 7 meses y la del ácido poliglicólico (PGA) es 5 meses.

II.3.2.3 La policaprolactona (PCL): este homopolímero se obtiene por polimerización de apertura de anillo de la ϵ -caprolactona, este polímero es semicristalino, poco hidrófilo, presenta un punto de fusión de 59-64°C y una temperatura de transición vítrea de -60°C.

Su degradación ocurre por hidrólisis y la velocidad de este proceso depende de la forma, del tamaño del dispositivo y de los aditivos. En su proceso de degradación primero ocurre una ruptura de cadenas, de forma que disminuye el peso molecular, y posteriormente estas cadenas, más pequeñas son transportadas fuera del sitio de implantación por los fluidos del cuerpo o fagocitosis. El homopolímero puede degradarse en un periodo comprendido entre 2 y 4 años, pero la velocidad de degradación puede aumentarse por copolimerización con poliácido láctico o glicólico.⁽³⁾

II.3.2.4 Copolímeros: La forma copolimérica (PLGA) se obtiene del ácido poliláctico y ácido poliglicólico respectivamente, en proporciones 50:50. También encontramos al copolímero (PLA-PCL) que se obtiene del ácido poliláctico y de la policaprolactona en proporciones de 80:20 respectivamente. Se forman copolímeros con la finalidad de acelerar la velocidad de degradación.

II.3.2.5 Poliortoésteres:

Constituyen los primeros polímeros investigados que presentan una adecuada biocompatibilidad, sufren un proceso de bioerosión heterogénea o en la superficie. La bioerosión de los poliortoésteres puede ser modificada dentro de amplios rangos por medio de ácidos, incorporados a la matriz polimérica, pero en estos casos no es posible mantener una erosión superficial más de una semana.

II.3.2.6. Características fisicoquímicas:

En el siguiente cuadro, se detallan las principales características fisicoquímicas de los polímeros empleados en este trabajo de investigación: ^{(2) (5) (7) (8) (9) (10) (11)}

Polímeros	Viscosidad inherente (dL/g)	Temperatura de cristalización (T _m) (°C)	Temperatura de transición Vítrea (T _g) (°C)
Poly(D,L-Láctico) (R207)	1,3-1,7	Amorfo	55-60
Poly(D,L-Láctico) (R104)	0,64	Amorfo	55-60
Polycaprolactona	1,00-1,30	58-63	(-65)-(-60)
50:50 Poly (D,L-Láctico-glicólico) (RG502)	0,16-0,24	Amorfo	42-46
50:50 Poly (D,L-Láctico-glicólico) (R504)	0,58	Amorfo	46-50
50:50 Poly (D,L-Láctico-glicólico) (R502)	0,20	Amorfo	42-46
50:50 Poly (D,L-Láctico-glicólico) (RG504)	0,45-0,60	Amorfo	46-50
75:25 Poly (D,L-Láctico-glicólico) (RG756S)	0,71-1,00	Amorfo	49-55
80:20 Poly (D,L-Láctico-ε-caprolactona)	0,77	Amorfo	17-23

II.4. Mecanismos de bioerosión:

Existen tres mecanismos generales de erosión: ⁽³⁾

1.- Tipo I: se rompe la estructura tridimensional de la red polimérica, lo que facilita el proceso de solubilización. Los dispositivos fabricados con estos materiales presentan el problema de que la matriz se va hinchando, a medida que se va erosionando, por lo que pierde su estabilidad dimensional.

2.- Tipo II: una macromolécula insoluble se solubiliza por reacción química: hidrólisis, ionización, o protonación. No se produce una desintegración del polímero, pues su tamaño no se altera, es simplemente un proceso químico que introduce grupos que facilitan la solubilización. Estos polímeros se emplean principalmente como recubrimiento que permiten controlar el lugar de liberación del fármaco, por ejemplo existen medicamentos recubiertos con ellos que están diseñados para ser insolubles a ciertos pH (generalmente en el estómago), pero se disuelven drásticamente al llegar al intestino.

3.- Tipo III: mediante este mecanismo de bioerosión polímeros de alto peso molecular, son convertidos en moléculas más pequeñas por ataque a determinados grupos lábiles. La principal aplicación de este tipo de polímero es para la fabricación de implantes subcutáneos, intramusculares o intraperitoneales.

II.5. Mecanismos de liberación:

La liberación del principio activo puede ocurrir por cualquiera de los siguientes mecanismos: ⁽³⁾

- El agente activo se une covalentemente al polímero y se libera debido a que su unión es lábil y puede ser fácilmente hidrolizada.
- El agente activo está contenido en el interior de una membrana bioerosionable. Se trata de un dispositivo tipo reservorio que permite liberar el fármaco de forma constante reabsorbiéndose posteriormente. Para que actúe de forma eficaz es necesario que el tiempo de degradación de la membrana sea mucho mayor que el tiempo de liberación.

- El agente activo se dispersa homogéneamente en el polímero (se trata tanto de un dispositivo de tipo monolítico) y la liberación se produce por un proceso de difusión, de erosión o por una mezcla de ambos.

II.6. Características de estos sistemas bioerosionables: ⁽³⁾

- La liberación debe ser totalmente controlada y predecible.
- Deben ser biodegradarse y los productos de este proceso no deben ser: tóxicos, inmunógenicos, irritantes, teratogénicos, y por supuesto tampoco carcinogénicos.
- El polímero y sus productos de degradación deben poderse eliminar del organismo durante un periodo razonable de tiempo después de que hayan liberado el fármaco.
- Debe ser esterilizable.
- El diseño y fabricación del dispositivo deben ser fáciles y de bajo costo.
- El polímero debe proteger al fármaco del bioentorno mientras que éste se encuentra dentro del dispositivo esperando ser liberado.

II.7. Métodos de obtención de las micropartículas: ^{(1) (2) (4) (7) (13) (14) (15) (16)}

Existen varios métodos para la preparación de micropartículas biodegradables, los métodos de obtención comúnmente empleados, encontrados en la literatura son:

- 1.- Método de la doble emulsión (A₁/O/A₂) - evaporación del solvente.
- 2.- Separación de fases.

La elección de la técnica de microencapsulación se hace principalmente sobre la base de las características fisicoquímicas del polímero y del principio activo a microencapsular.

En este trabajo de investigación empleamos el método de la doble emulsión (A₁/O/A₂)- evaporación del solvente que detallaremos a continuación:

1.- Método de la doble emulsión (A₁/O/A₂) - evaporación del solvente:

Método también conocido como método de la emulsión múltiple. Este método es específico cuando se requiere microencapsular principios activos hidrosolubles. En este método el polímero se disuelve en un solvente orgánico, en este caso en diclorometano (DCM) y se forma un gel viscoso (Fase orgánica). El principio activo se disuelve en agua (Fase interna acuosa).

Se incorpora la fase acuosa (A₁) sobre la fase orgánica (O) y se obtiene la primera emulsión (A₁/O), la que se adiciona lentamente sobre un medio acuoso que contiene un tensioactivo (Fase externa acuosa) y se forma la segunda emulsión o emulsión final. Luego el solvente orgánico es eliminado por evaporación y se obtienen las micropartículas.

III. PARTE EXPERIMENTAL:

III.1.- MATERIALES, EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y REACTIVOS

III.1.1 Elaboración de Micropartículas:

1.-Polímeros:

- Polycaprolactona (PCL), Aldrich Chemical Company, EE.UU.
- Poly (D, L-Láctico) (R207S) (PLA), Boehringer Ingelheim, Alemania.
- Poly (D, L-Láctico) (R104) (PLA), Boehringer Ingelheim, Alemania.
- 50:50 Poly (D, L-Láctico-glicólico) (RG504) (PLGA), Boehringer Ingelheim, Alemania.
- 50:50 Poly (D, L-Láctico-glicólico) (RG502) (PLGA), Boehringer Ingelheim, Alemania.
- 75:25 Poly (D, L-Láctico-glicólico) (RG756S) (PLGA), Boehringer Ingelheim, Alemania.
- 80:20 Poly (D, L-Láctico- ϵ -caprolactona) (PLA-PCL), Absorbable Polymers International, EE.UU.

2.-Solventes:

- **Diclorometano (DCM):** Panreac Química, España.
- **Acetona:** Panreac Química, España.
- **2-Propanol (HPLC-gradiente-UV-IR):** Panreac Química, España.
- **Agua desionizada** (Milli-Q).

3.-Tensioactivo: Alcohol Polivinílico (PVA) (M.=100.000 g/mol, grado de hidrólisis 89%): Aldrich Chemical Company, EE.UU.

4.-Principio activo hidrosoluble, modelo Aldrich Chemical Company, EE.UU.

5.-NaCl: Panreac Química, España.

6.-Filtros:

- Policarbonato (10µm TCTP), Millipore, España. Ø = 45mm.
- Nitrocelulosa (5 µm SMWP), Millipore, España. Ø = 45mm.

7.-Material de vidrio (uso general en laboratorio).

8.-Agitador Vortex marca IKA. Modelo MS1 Minishaker.

9.-Homogenizador Polytron. PT 3000 X 10008rpm. Kinematic.

10.-Homogenizador ULTRA-TURRAX marca IKA. Modelo T 25 Basic.

11.-Rotavapor marca IKA. Vacuum Controller B-721.

12.-Agitador de hélice marca IKA. Modelo EUROSTAR power control-visc.

13.-Equipo de filtración con bomba de vacío. Marca BÜCHI. Modelo Vacuum Controller V-800.

14.-Balanza analítica Mettler.

III.1.2 Caracterización de las micropartículas:

III.1.2.1 Tamaño y aspecto de las micropartículas:

- 1.-Microscopio óptico. Olympus CH40.
- 2.- Microscopio electrónico de barrido (SEM) (Scanning Electron Microscope Jeol JX 840-A JEOL Ltd.).
- 3.-Equipo Microtraq SRA 150. Marca Leeds & Northrup Instrumens.

III.1.2.2 Carga de las micropartículas:

- 1.-**Tetrahidrofurano (UV-IR-HPLC-GPC):** Panreac Química, España.
- 2.-**Diclorometano (DCM):** Panreac Química, España.
- 3.-**Agua desionizada (Milli-Q).**

- 4.-Filtros de Nylon (0,45 μ m).Millipore, España.
- 5.-Jeringuillas de 10mL.
- 6.-Matraces aforados de 10mL,
- 7.-Tubos de centrifuga.
- 8.-Centrifuga Hettich Zentrifugen, Génesis Instrumentación, S.L.
- 9.-Espectrofotómetro ultravioleta-visible. (UV-VIS). Marca: Beckman. Modelo: DU-7.

III.1.2.3 Estudio de liberación in Vitro del fármaco (Ensayo de cesión):

- 1.-Solución amortiguadora de fosfatos (PBS- pH 7,4): (USP 32, 894).
- 2.-Material de vidrio (uso general en laboratorio).
- 3.-Tubos de plástico con tapa a presión, eppendorf de 2mL.
- 4.-Gradillas de plástico, gradillas de aluminio.
- 5.-Jeringuillas de 2,5mL.
- 6.-Agujas estériles (BD Microlance TM 3) (23G 1 0,6x25 Nr.16).
- 7.-Filtros de membrana de acetato de celulosa (0,20 μ m) (13mm polypropileno).
- 8.-Baño de agitación a 37°C. Modelo: Clifton M NE-28, +/- 0,2°C.
- 9.-Agua desionizada (Milli-Q).
- 10.-Termómetro.
- 11.-Micropipeta eppendorf. (500 μ L -5000 μ L).
- 12.-Espectrofotómetro ultravioleta-visible. (UV-VIS). Marca: Beckman. Modelo: DU-7.

III.2.- METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

III.2.1 Elaboración de Micropartículas I (Figura 3):

Las micropartículas I fueron elaboradas por el método de la **dobles emulsión (A₁/O/A₂)- evaporación del solvente convencional y sin incorporar p.a. (MP blancas)**.

Se disuelve Xg de polímero en 2mL de DCM, a esta mezcla se añade 3mL de acetona (**Fase O**). Sobre un baño de hielo, se incorpora la **fase A₁ (300 µL de agua)** a la **fase O**, luego se agita en el equipo Ultra Turrax a 24 000 rpm/ 5min.

La primera emulsión formada (**A₁/O**) se añade a los 250mL de la **fase A₂ (Solución acuosa de PVA al 0,5%)**, y se agita en el equipo **Polytron a 8000 rpm/5min**.

Con la ayuda de una pipeta pasteur se toma una muestra en un portaobjetos, para observar al microscopio óptico si se han formado micropartículas. Si se han formado MP, se continúa con la eliminación del solvente utilizando **el rotavapor a 250 Torr/50rpm/2.5h**. Finalmente se obtienen las micropartículas mediante filtración con bomba de vacío empleando filtros 10µm TCTP.

- **Polímeros y sus respectivos porcentajes empleados en la elaboración de las**

Micropartículas I:

- 1.-PCL al 10%.
- 2.-PLA (R207) al 25%.
- 3.-PLA-PCL (80/20) al 20%.
- 4.-PLGA (RG504) al 15%.

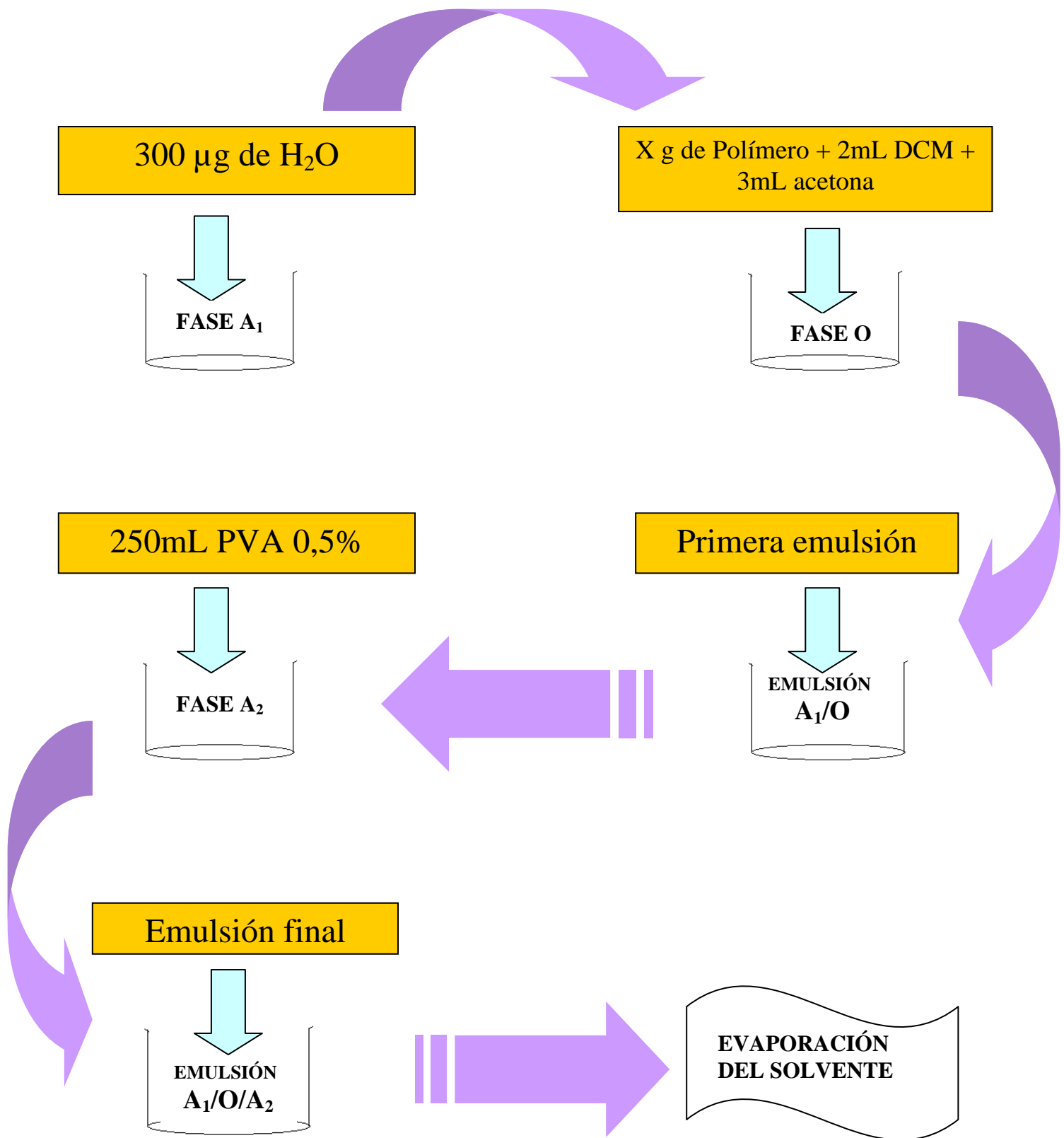


Figura 3. Diagrama de elaboración de Micropartículas I (MP Blancas) por el método de la doble emulsión (A1/O/A2) - evaporación del solvente convencional.

III.2.2 Simplificación del Método Tecnológico empleado en la Elaboración de las Micropartículas II:

Las Micropartículas II, se elaboraron mediante el método de la doble emulsión- evaporación del solvente de las MP I, simplificando aspectos tecnológicos.

Se elaboran nuevos lotes de micropartículas blancas utilizando un solo polímero (RG 504), empleando el siguiente método simplificado:

MP II	
FORMULACIÓN: VOLÚMENES DE LAS FASES A₁/O / A₂	
8mL Diclorometano (DCM). 12mL Acetona. (Fase O)	Se mantiene la proporción de volúmenes: Fase A₁ / Fase O
1,2mL agua desionizada (Fase A₁)	
Solución acuosa de PVA (Fase A₂)	
SISTEMA Y VELOCIDAD DE AGITACIÓN: FORMACIÓN DE LA SEGUNDA EMULSIÓN (A₁/O/A₂)	
Agitación en sistema de hélice a una velocidad de 800rpm/30min , obtención de la segunda emulsión. (Fase A₁/O/A₂).	
MÉTODO DE EVAPORACIÓN DEL SOLVENTE	
Eliminación del solvente mediante agitación en sistema de hélice , disminuyendo la velocidad de agitación a 200rpm/3 horas .	

III.2.3 Influencia de los Factores Tecnológicos y de Formulación en el

Aspecto y Tamaño de las micropartículas:

La evaluación de la posible influencia de los factores tecnológicos y de formulación se realizó empleando micropartículas blancas elaboradas con el polímero (RG504).

Los factores estudiados fueron:

- 1.-La formulación (concentración del polímero, tipo y volumen del disolvente empleado en la fase orgánica, porcentaje de tensioactivo usado en la fase externa acuosa, volumen de la fase externa acuosa, uso de aditivos).
- 2.-La velocidad de agitación del segunda emulsión.
- 3.-Método y tiempo de evaporación del solvente.

III. 2.3.1 Micropartículas III (Figura 4):

- **La fase orgánica sin acetona.**
- **Variación de la fase externa acuosa:** se reduce su volumen a 200mL y aumenta la concentración de PVA a 1%.
- El sistema, velocidad de agitación en la formación de la segunda emulsión y el método de evaporación del solvente se mantiene constante.

En la Figura 4, se muestran las modificaciones evaluadas en las MP III.

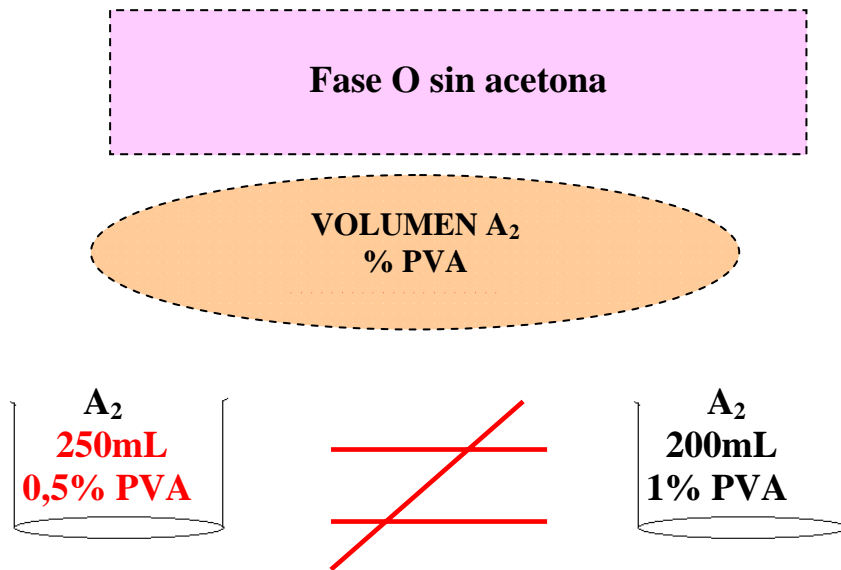


Figura 4. Esquema de los factores evaluados en las MP III.

III. 2.3.2 Micropartículas IV (Figura 5):

- Incorporación de un aditivo (**isopropanol**), después de agitación constante durante 30 min de la emulsión final formada ($A_1/O/A_2$). Se añade este aditivo por su miscibilidad en H_2O para extraer el diclorometano de la fase orgánica a la fase acuosa externa, favoreciendo así la formación de las MP. ⁽¹⁴⁾
- Se mantienen constante todos los demás factores.

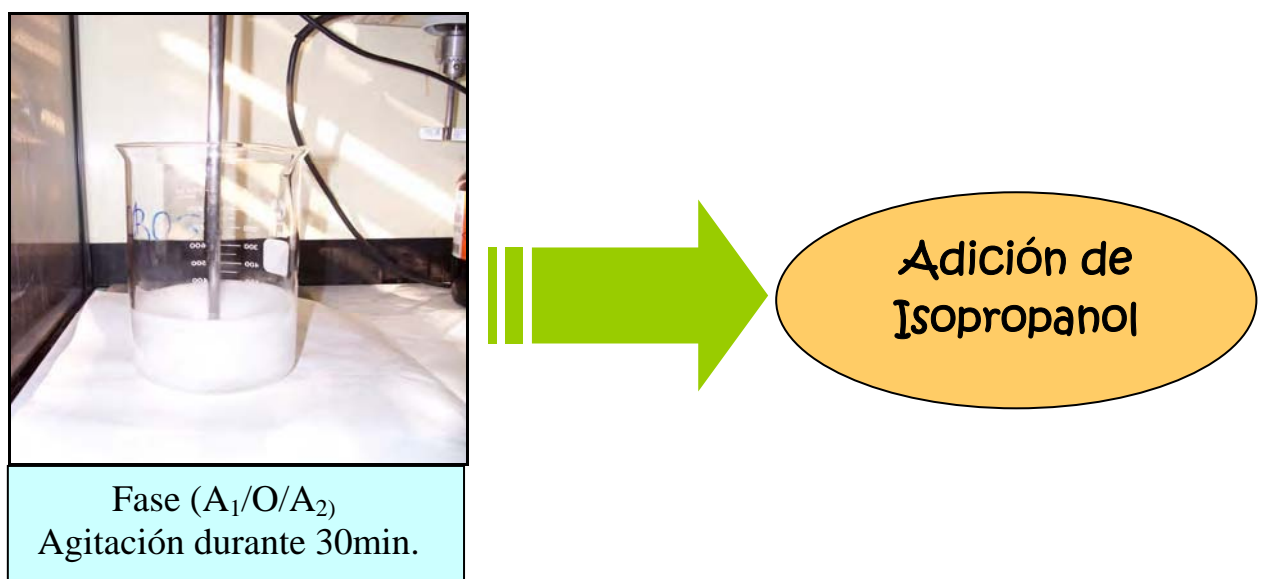


Figura 5. Esquema del factor evaluado en las MP IV.

III.2.3.3 Micropartículas V (Figura 6):

- Aumentamos el tiempo de evaporación del solvente de 3 a 4 horas de agitación.
- Se mantienen constante todos los demás factores.

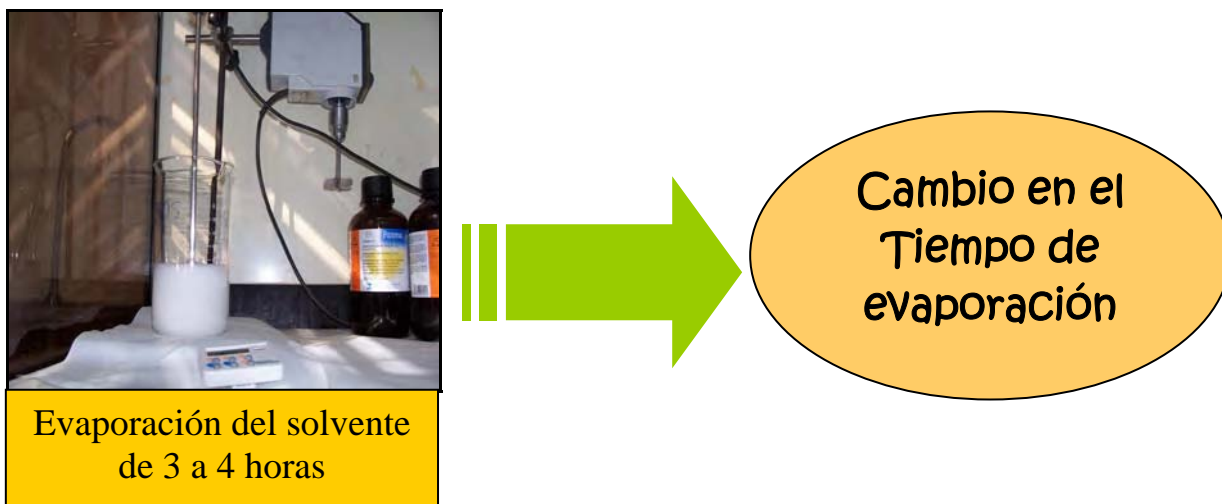


Figura 6. Esquema del factor evaluado en las MP V.

III.2.4 MÉTODO OPTIMIZADO:

Luego de evaluar la posible influencia de los factores tecnológicos y de formulación en el aspecto y tamaño de las micropartículas, se decide elaborar un lote de de MP cargadas con un fármaco hidrosoluble, se sigue empleando el mismo polímero (**RG504**) pero se utiliza el siguiente **Método**, que se obtiene a partir del método simplificado más las modificaciones obtenidas luego de evaluar los factores tecnológicos y de formulación. (Selección de las mejores condiciones).

En la Figura 7 se detalla cada uno de los procedimientos seguidos en la elaboración de las MP cargadas.

MÉTODO MP CARGADAS



840mg RG 504
+
20mL de DCM } Fase O



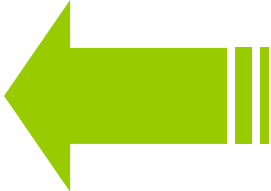
**Agitar en el vortex,
el gel viscoso formado
(Fase O)**

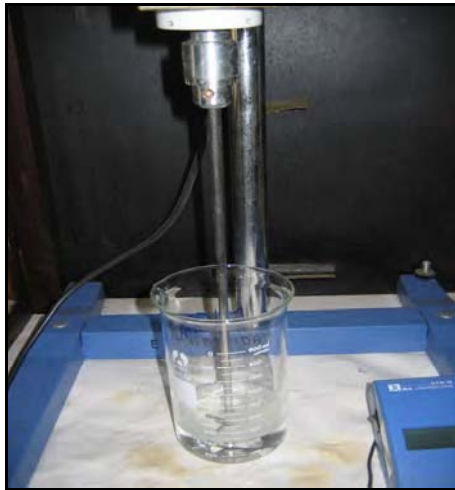


**Formación de la 1ra
emulsión A₁/O**



**Incorporación de la Fase A₁
con principio activo
hidrosoluble en la Fase O**





PVA 1% (Fase A₂)



**Incorporación de la 1ra emulsión (A₁/O) a la Fase A₂ (A₁/O/A₂)
Agitación en sistema de Hélice a 800rpm/30min.**



Filtración con bomba de vacío



Añadir 10mL de isopropanol y continuar con la agitación en hélice pero disminuyendo la velocidad (200rpm/4 horas).

Figura 7. Diagrama de Elaboración de MP con fármaco hidrosoluble.

III.2.5. Optimización para mejorar la cantidad de fármaco encapsulado:

(Figura 8 y 9)

Se añadió un aditivo (NaCl al 9%) en la fase externa acuosa (A_2), para intentar aumentar la encapsulación del fármaco hidrosoluble al disminuir la difusión del fármaco de A_1 a A_2 .⁽¹⁷⁾

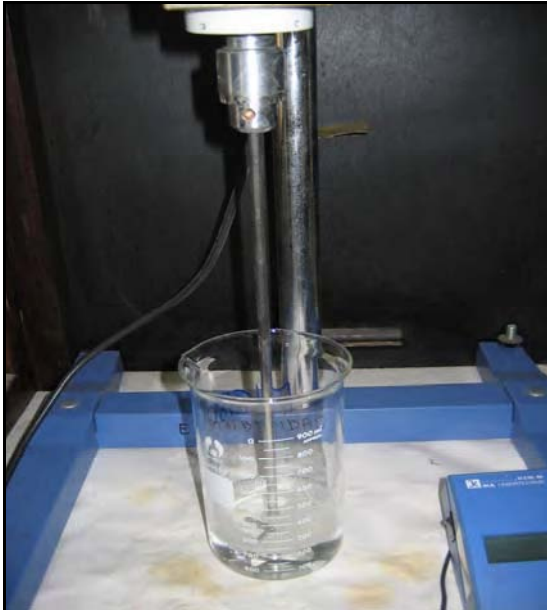


Figura 8. Fase externa acuosa

200mL de PVA 1%
Fase externa (A_2)



Figura 9. Incorporación del aditivo.

Incorporación de NaCl a la
Fase externa acuosa (A_2)

III.2.6. Elaboración de MP cargadas empleando el Método Optimizado:

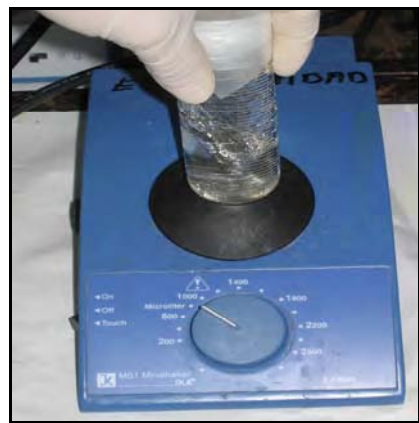
Después de incluir en el Método Optimizado la incorporación de la sal (NaCl 9%) en la fase externa acuosa para mejorar la cantidad de fármaco encapsulado, se decide elaborar lotes de MP cargadas empleando los 7 polímeros mencionados inicialmente.

La Figura 10 muestra los pasos a seguir para elaborar micropartículas cargadas mediante el Método Optimizado incluyendo la incorporación de la sal en la fase externa acuosa.

Método optimizado:



840mg polímero
+
20mL de DCM } Fase O



**Agitar en el vortex,
el gel viscoso formado
(Fase O)**



**Formación de la 1ra
emulsión A₁/O**



**Incorporación de la Fase A₁
con principio activo
hidrosoluble en la Fase O**



PVA 1% (Fase A₂)



Incorporación de NaCl a la Fase externa acuosa (A₂)



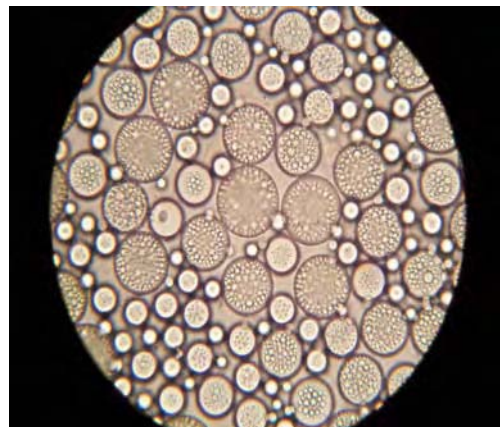
Añadir 10mL de isopropanol y continuar con la agitación en hélice pero disminuyendo la velocidad (200rpm/4 horas).



Incorporación de la 1ra emulsión (A₁/O) a la Fase A₂ (A₁/O/A₂) Agitación en sistema de Hélice a 800rpm/30min.



Filtración con bomba de vacío



Micropartículas

Figura 10. Esquema de la elaboración de MP cargadas.

III.2.7. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS:

Los lotes de micropartículas blancas fueron caracterizados en función a:

- Aspecto de las micropartículas.
- Rendimiento del proceso.

Los lotes obtenidos de micropartículas cargadas con fármaco hidrosoluble con los 7 polímeros, empleando el Método Optimizado fueron caracterizados en función a:

- Determinación del tamaño y aspecto de las micropartículas.
- Rendimiento del proceso.
- Determinación de la cantidad de fármaco encapsulado (carga).
- Ensayo de cesión in vitro.

III.2.7.1 Determinación del tamaño y aspecto de las micropartículas:

Las técnicas de análisis del tamaño de partícula son muy diversas, principalmente: tamización, sedimentación, método Coulter, difracción de luz láser y microscopía.

El tamaño y aspecto (morfología) de las micropartículas, se ha analizado mediante la utilización de diferentes técnicas:

- **Microscopía óptica:** Morfología, el aspecto de su superficie (lisa o rugosa); tamaño (pequeñas, medianas o grandes; dispersión u homogeneidad).
- **Microscopía electrónica de barrido (SEM):** está técnica permite describir la morfología de las micropartículas y obtener medidas del diámetro de las partículas, importante para su administración parenteral por vía subcutánea. Se requiere depositar las muestras secas en un porta alto previamente limado y fijarlas

formando una fina capa, a continuación se procede a recubrir las muestras con grafito y después con oro en una atmósfera controlada a vacío.

Las muestras preparadas se introdujeron al microscopio y se tomaron fotografías de los distintos lotes de micropartículas cargadas con fármaco hidrosoluble obtenidas empleando el método optimizado.

- **Difractometría láser:** esta técnica nos permite determinar el tamaño de las micropartículas, una característica que ha de ser controlada para su administración parenteral por vía subcutánea. Este análisis se lleva a cabo mediante la dispersión en agua desionizada de una pequeña cantidad de micropartículas obtenidas. Las muestras se introducen en la celda (difractómetro), se somete a agitación constante y a la iluminación por rayos láser, de manera que su difracción permite calcular el tamaño de las micropartículas que interfieren la trayectoria del láser. Proporciona datos de diámetros estadísticos que representan el total de las micropartículas, diagramas de distribución de tamaños y datos de la amplitud de esta distribución.

III.2.7.2 Rendimiento del proceso:

El rendimiento del proceso fue obtenido mediante balanza de masa. El rendimiento de fabricación para cada lote de micropartículas elaboradas con un respectivo material polimérico se calcula como el cociente entre la cantidad de micropartículas obtenidas tras la fabricación (Peso de las MP secas) y la cantidad de producto empleado en la elaboración de las micropartículas (Peso inicial del polímero + fármaco), expresado en tanto por uno. Para expresarlo en porcentaje se multiplica por cien.

Aplico la siguiente fórmula para el cálculo del rendimiento del proceso de elaboración:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso Mp secas obtenidas}}{\text{Peso inicial (polímero+p.a)}} \times 100$$

III.2.7.3 Determinación de la cantidad de fármaco encapsulado (carga):

Se determinó mediante espectrofotometría ultravioleta siguiendo un método ya validado. ⁽¹⁸⁾

Método analítico: 20 mg de micropartículas secas se disolvieron totalmente en 7mL de tetrahidrofurano mediante agitación magnética, el principio activo hidrosoluble se extrae con 3mL de agua destilada. Centrifugar a 3000rpm/5min y leer a la longitud de onda más específica.

Para seleccionar la longitud de onda más específica se preparó una solución del p.a y se hizo un barrido, tal como se observa en la Figura 11.

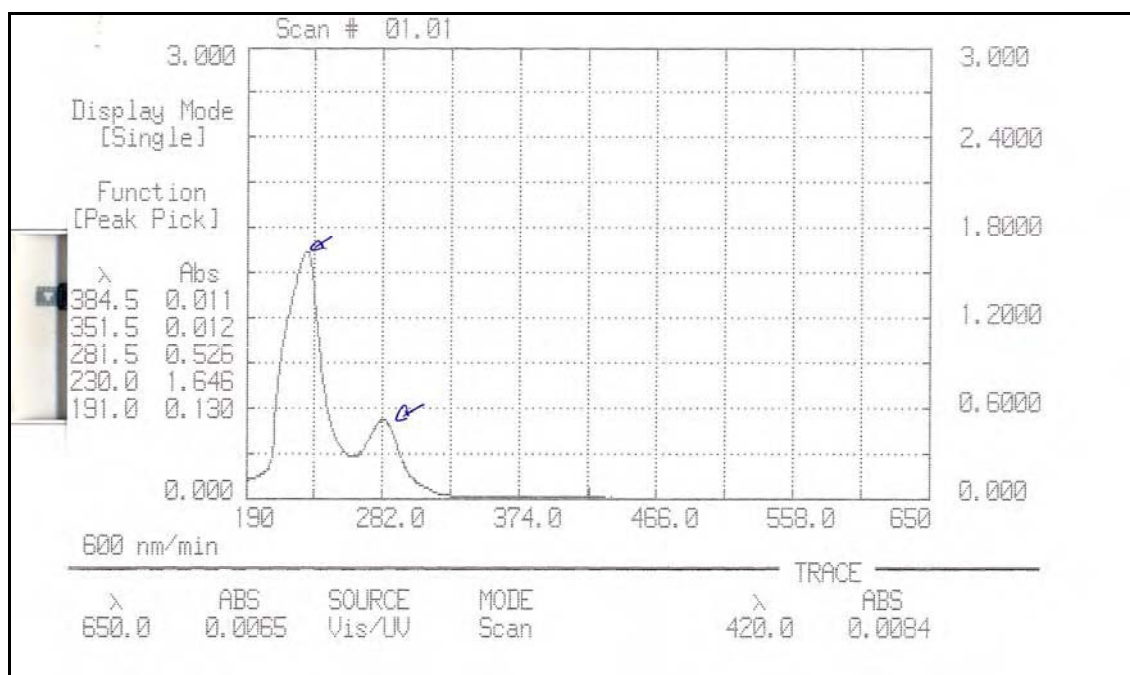
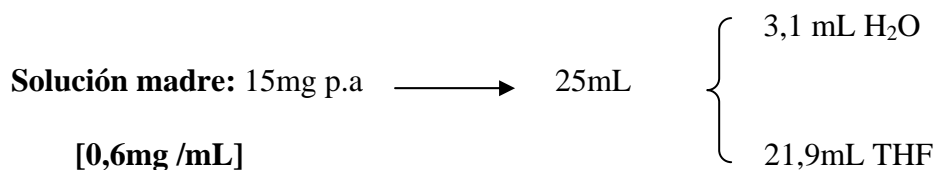


Figura 11. Barrido de la solución del p.a, siendo las longitudes de máxima absorbancia 230.0 nm y 281,5 nm.

Para realizar **la curva de calibrado**, se realizaron diluciones a partir de una solución madre:



Estas diluciones se analizaron por espectrofotometría de absorción en el ultravioleta / visible ($\lambda = 281.0$), porque a pesar de ser menos sensible es más específica cuando se trabaja con polímeros.

Para calcular el contenido de fármaco presente en las micropartículas se toma como referencia la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia} = 0,0039 \times \text{Concentración} - 0,036$$

En la siguiente gráfica aparece representada la curva de calibrado a partir de cuya ecuación se calcula el contenido de p.a en las micropartículas.

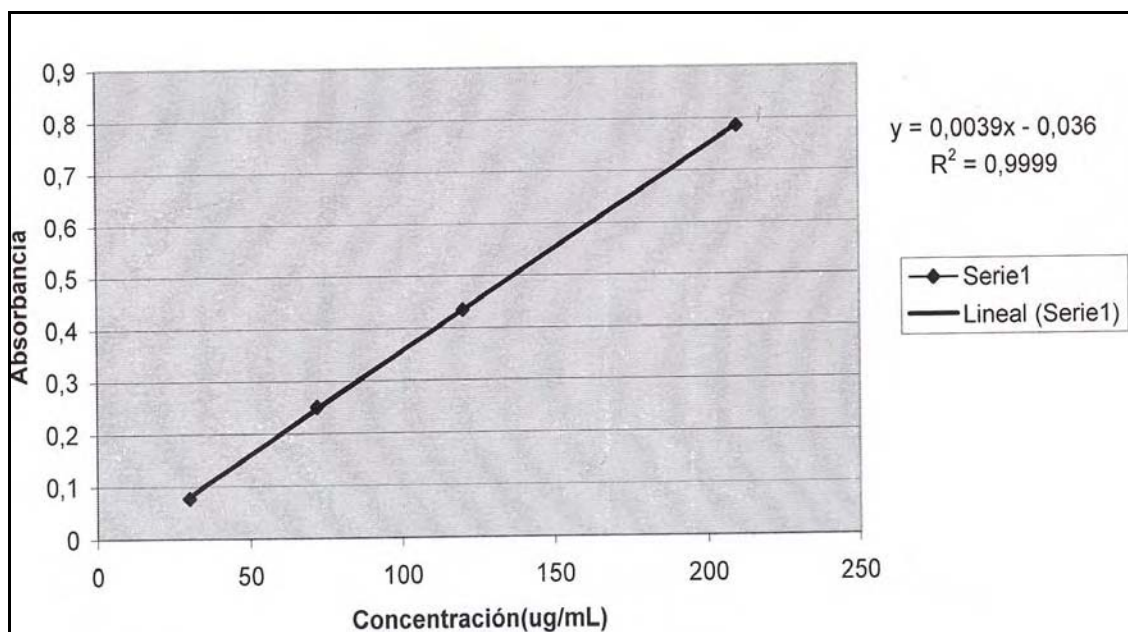


Figura 12. Curva de calibración del fármaco hidrosoluble en THF: Agua (7:1).

III.2.7.4. Determinación del ensayo de cesión in vitro:

Para la realización de estos ensayos se ha empleado un baño de agitación constante conteniendo agua desionizada hasta cubrir el nivel de las muestras, que permita mantener la temperatura del medio de disolución a $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

En la siguiente figura se muestra el baño de agitación modelo: Clifton M NE-28, $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$, empleado en el ensayo de cesión in vitro realizado a las micropartículas. ^{(17) (19)}



Figura 13. Baño de agitación (Ensayo de cesión in vitro).

La figura 14, nos muestra la colocación de las muestras en el baño, en recipientes cerrados y el nivel que debe cubrir el agua los tubos.

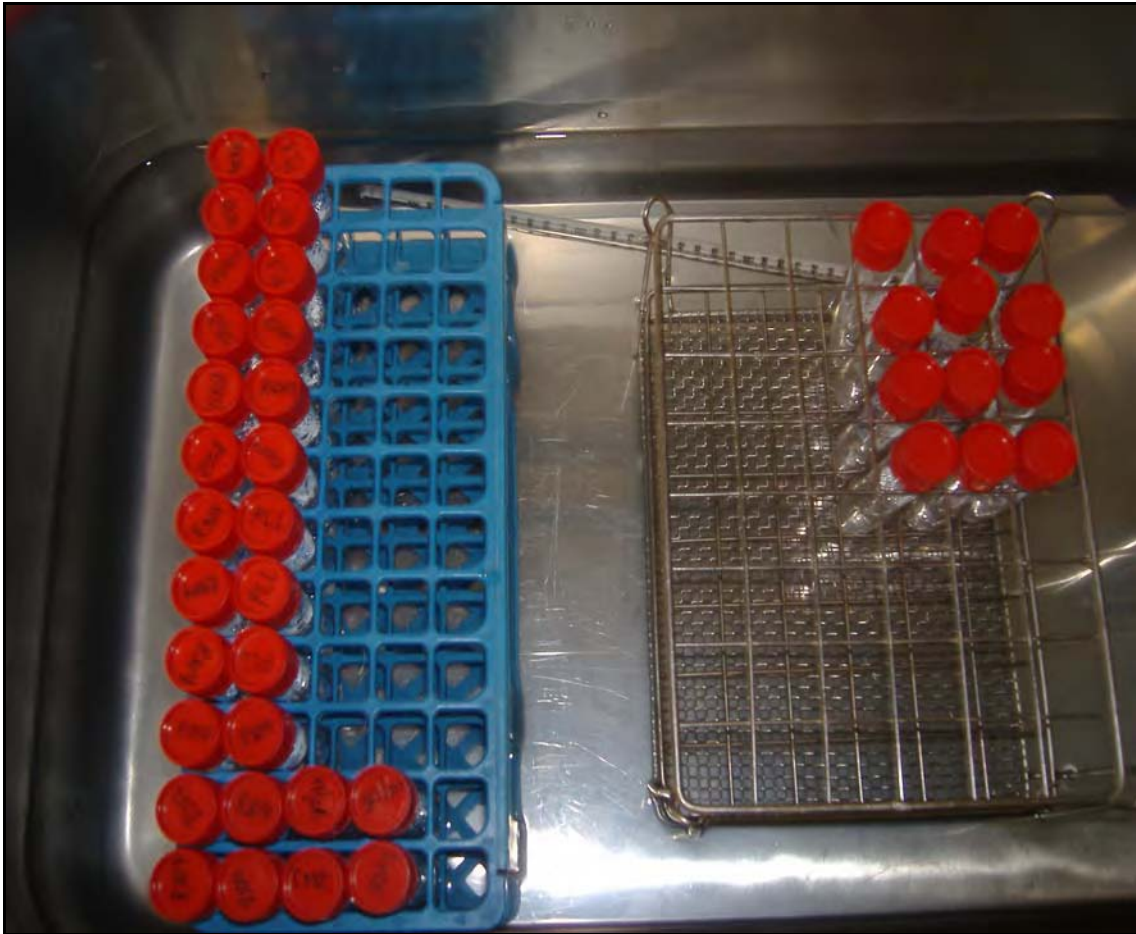


Figura 14. Muestras colocadas dentro del baño de agitación.

Las condiciones del ensayo de disolución utilizadas fueron: ⁽¹⁷⁾⁽¹⁹⁾

- **Medio de disolución:** Tampón fosfato pH 7,4. (PBS).
- **Equipo:** baño de agitación a $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.
- **Velocidad de agitación:** 50rpm.
- **Muestras:** se pesó una cantidad de MP secas equivalente a la dosis semanal de p.a, para cada polímero estudiado. **(Tabla 1).**

Polímero	Cantidad (mg)
50:50 PLGA (RG 502)	221,8
50:50 PLGA (RG 504)	268,6
75:25 PLGA (RG 756S)	745,0
PCL	386,9
PLA (R207S)	330,6
PLA (R104)	215,9
PLA-PCL (80/20)	421,94

Tabla 1. Cantidad (mg) de MP utilizada en el ensayo de cesión.

Se evaluó por triplicado para cada tipo de polímero. **Controlando el medio de ataque (PBS), la agitación y la temperatura, intentando simular las condiciones “in vivo”.**

- **Tiempos de muestreo (día):** 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14.
- Se realiza la toma de muestra para cada tipo de polímero y la reposición del medio de disolución, en los tiempos antes señalados. Luego se procede a la valoración del fármaco cedido mediante espectrofotometría.

Al final del ensayo, se recogieron las MP, se dejaron secar y se analizó la cantidad de fármaco remanente que contenían estas MP, para poder cuantificar el fármaco que no se había cedido.

I.V.- RESULTADOS:

A continuación se detallan los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización de los diferentes lotes de micropartículas:

I.V.1 Micropartículas I (MP Blancas):

Las micropartículas I nos sirvieron para evaluar el rendimiento del proceso de microencapsulación y el aspecto de las MP obtenidas con los polímeros por el método de la doble emulsión- evaporación del solvente.

Rendimiento del proceso de las MP I: (Tabla 2)

Polímero	Rendimiento del proceso
PCL	69, 98%
PLA	44, 14%
PLA-PCL	52, 83%
PLGA	60, 53%

Se observó, que los valores de rendimiento del proceso de las MP I con los polímeros trabajados no son óptimos.

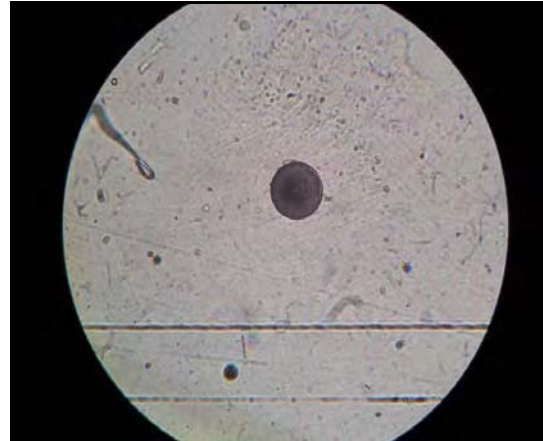
Aspecto de las MP I (Microscopía óptica):

En la siguiente figura se muestra el aspecto de las MP I mediante fotografías realizadas a las observaciones hechas al microscopio óptico con los polímeros: **PCL, PLA, PLA-PCL, PLGA.**

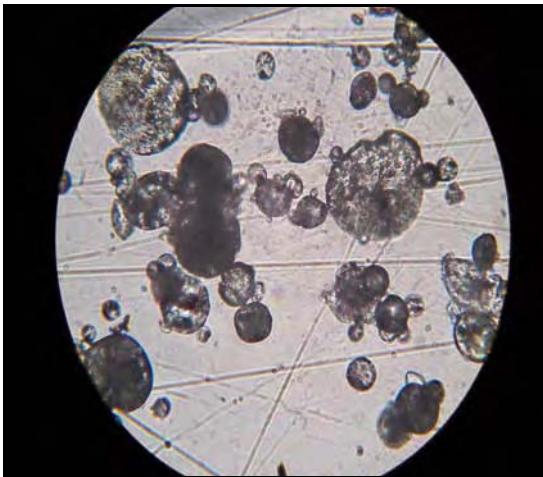
PLA



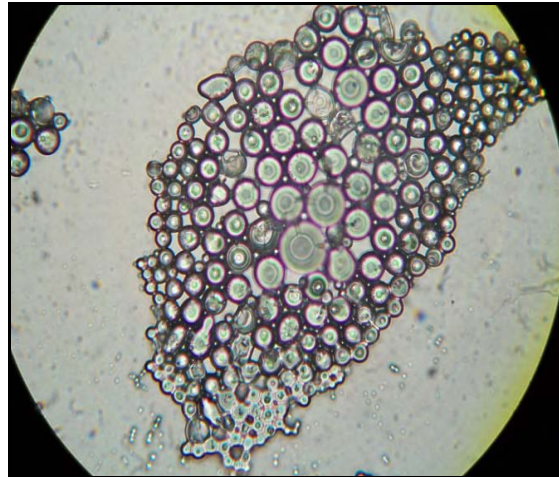
PLA



PCL



PLA-PCL



PLGA



PLGA

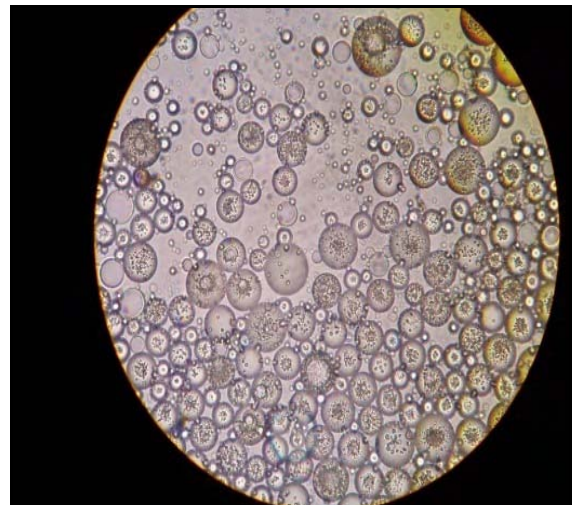


Figura 15. Fotos de las MP I hechas por microscopía óptica

Como observamos en las imágenes antes mostradas, los mejores resultados se observan con el copolímero de láctico – glicólico, vemos micropartículas de tamaño grande, medianas y pequeñas; dispersas u homogéneas, de morfología esférica y superficie lisa.

IV. 2 Simplificación del Método Tecnológico: Micropartículas II (MP Blancas):

Dado el bajo rendimiento obtenido con las MP I, se plantea una simplificación tecnológica del método de microencapsulación con el fin de minimizar las pérdidas.

- **Rendimiento:** 80, 65%.
- **Aspecto (Microscopía óptica):**

En la siguiente figura, se muestra micropartículas de tamaño grande, medianas y pequeñas, homogeneidad en la morfología, superficie, gran cantidad por campo óptico.

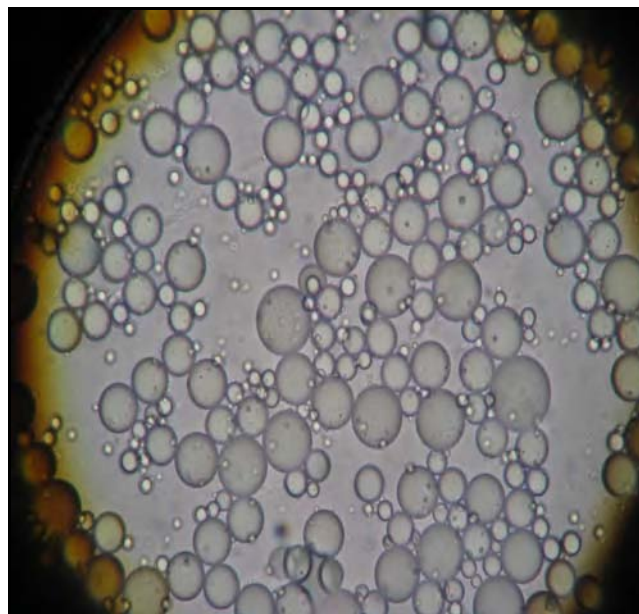


Figura 16. Foto de MP II

IV.3 Influencia de Factores Tecnológicos y de Formulación:

Evaluamos los factores tecnológicos y de formulación mediante la elaboración de las MP III, MP IV, MP V.

Micropartículas III (MP Blancas): PLGA: RG 504

- **Rendimiento:** 84%
- **Aspecto:** Homogeneidad en la morfología de las micropartículas, esféricas, paredes lisas, no agregadas, dispersión de tamaños.

Micropartículas IV (MP Blancas): PLGA: RG 504

(Incorporación de un aditivo)

- **Rendimiento:** 86%
- **Aspecto:** gran cantidad de micropartículas por campo óptico, esféricas, de tamaños medianos y pequeños, no hay diferencias antes y después de agregar el aditivo en las micropartículas.

Micropartículas V (MP Blancas): PLGA: RG 504

(Cambio en el tiempo de evaporación)

- **Rendimiento:** 85%
- **Aspecto:** homogeneidad en la forma, gran cantidad de micropartículas por campo óptico.
- **Observación:** al aumentar el tiempo de evaporación del solvente facilito la maduración de las micropartículas y asimismo el filtrado de las mismas.

I.V.4. Micropartículas cargadas con un fármaco hidrosoluble:

Se elaboraron MP cargadas con un sólo polímero (RG504), para comprobar el método optimizado, tras evaluar el rendimiento del proceso y el aspecto de las MP, se procedió a elaborar MP con los demás polímeros.

PLGA: RG 504 (120mg p.a + NaCl 9%):

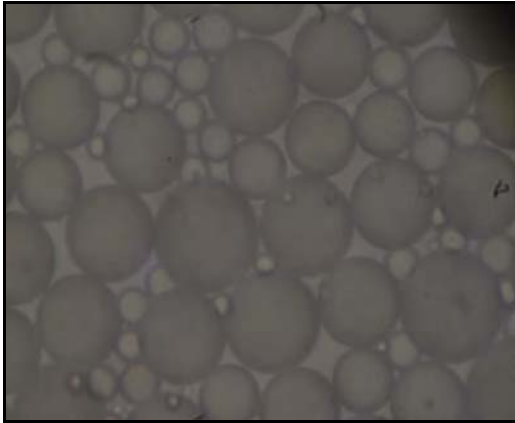
- **Rendimiento:** 84,77 %
- **Aspecto:** micropartículas esféricas, de superficie lisa, tamaño mediano y pequeño.

IV.5 Caracterización de MP cargadas:

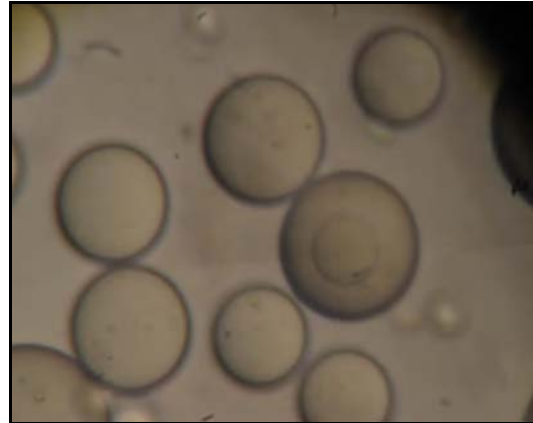
A partir de los 7 polímeros objeto de estudio, utilizando el Método Optimizado en su elaboración:

IV.5.1 Determinación del aspecto de las micropartículas:

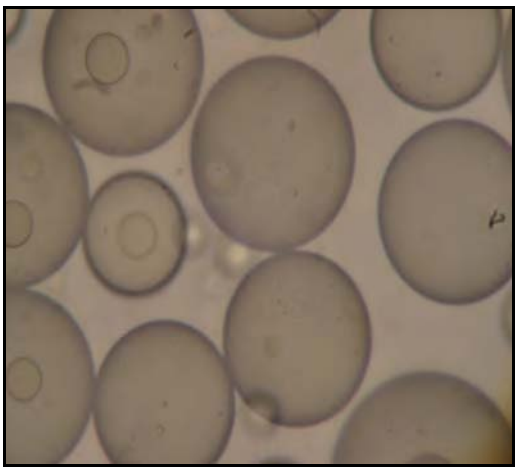
IV.5.1.1 Por microscopía óptica:



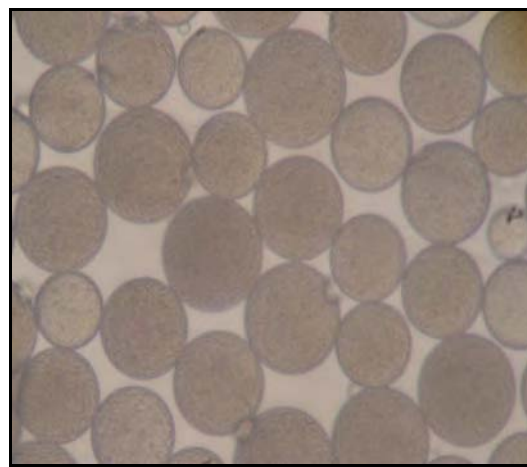
PLGA 50/50 (RG504)



PLGA 50/50 (RG502)



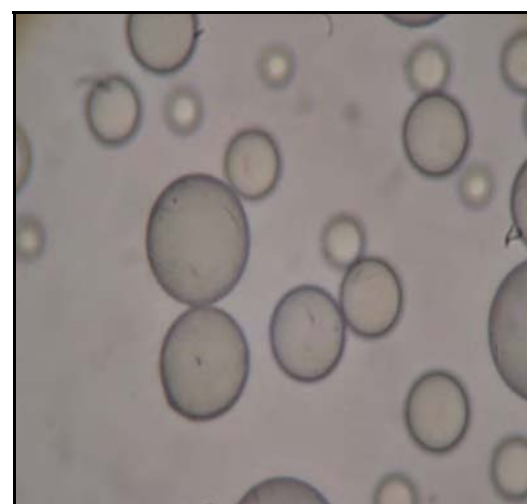
D, L-PLA (R207S)



D, L-PLA (R104)



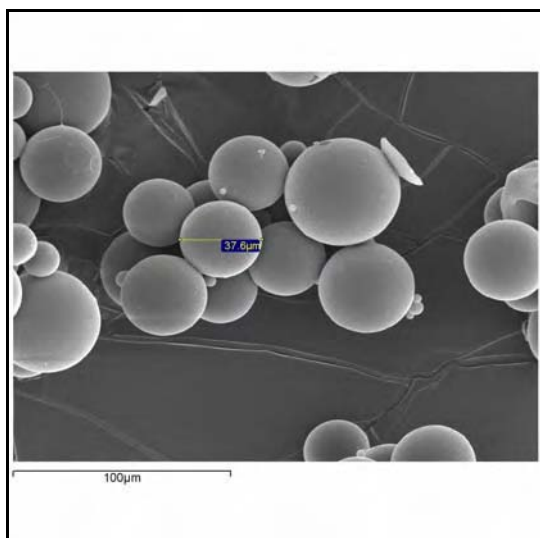
PLGA 75/25 (RG756S)



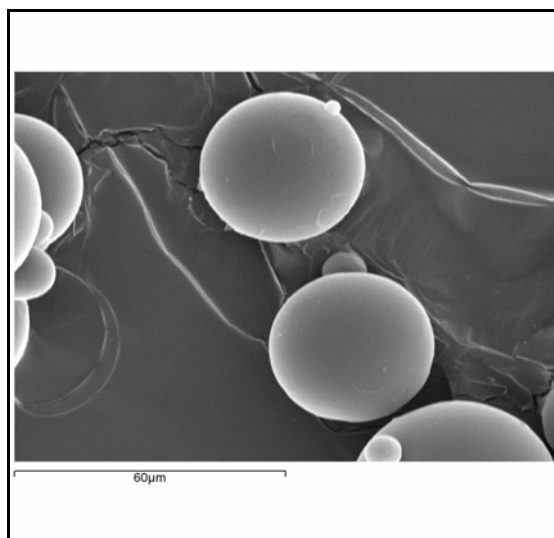
PLACL 80/20

Figura 17. Fotos de las MP obtenidas por microscopía óptica.

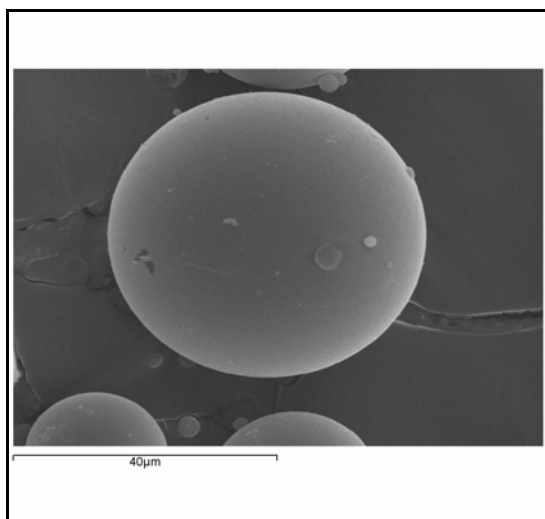
IV.5.1.2 Por microscopía electrónica de barrido (SEM):



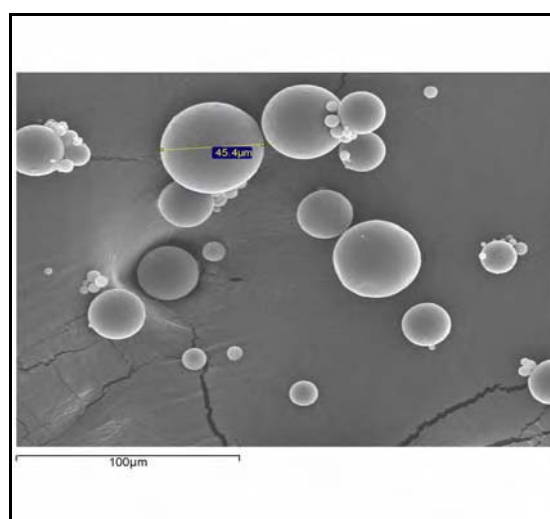
PLA-PCL 80/20 X 500



PLA-PCL 80/20 X 1000



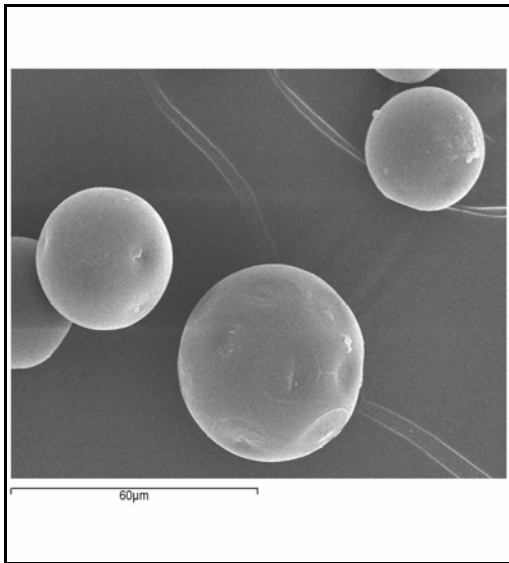
D, L- PLA (R104) x 1500



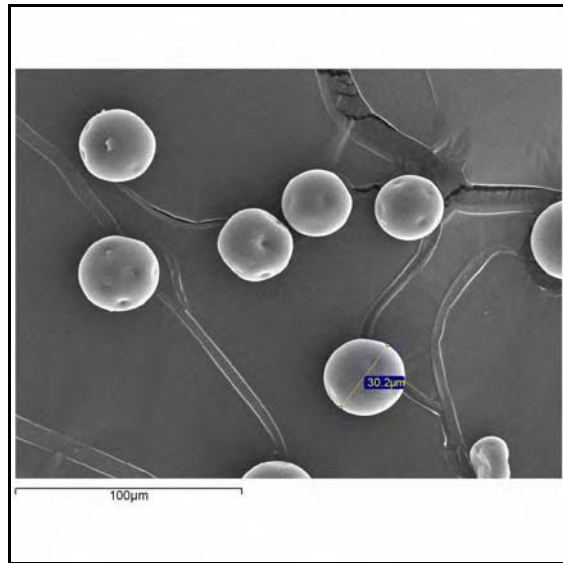
D, L-PLA (R207S) x 500

Figura 18. Fotos de las MP obtenidas (SEM).

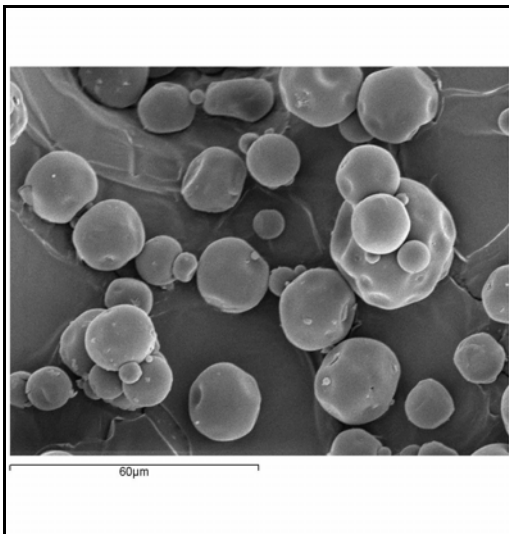
La figura 19, muestra fotografías de las MP (SEM), se observa la superficie lisa de las micropartículas, la forma esférica y la variedad de tamaño.



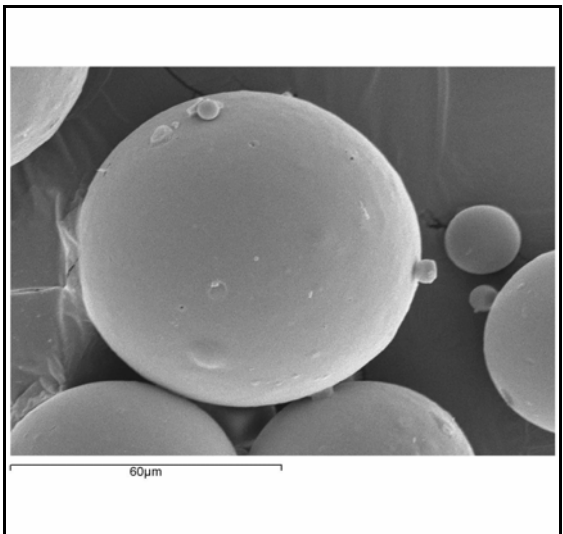
PLGA 50/50 RG 504 X 1000



PLGA 50/50 RG 504 X 500



PLGA 50/25 (RG 502) X 1000



PLA (R207) X 1000

Figura 19. Fotos de las MP obtenidas (SEM).

El aspecto de las micropartículas obtenidas mediante microscopía óptica muestra homogeneidad en la forma, micropartículas de tamaño pequeño, mediano y grande, algunas presentan superficie lisa y otras rugosas, se observan gran cantidad de

micropartículas por campo óptico. De las fotos obtenidas en el SEM con los 7 polímeros antes mencionados, se obtuvo un tamaño del diámetro de micropartículas cargadas comprendido entre **20 y 60 μm** , según el polímero empleado.

IV.5.2. Determinación del tamaño de las micropartículas:

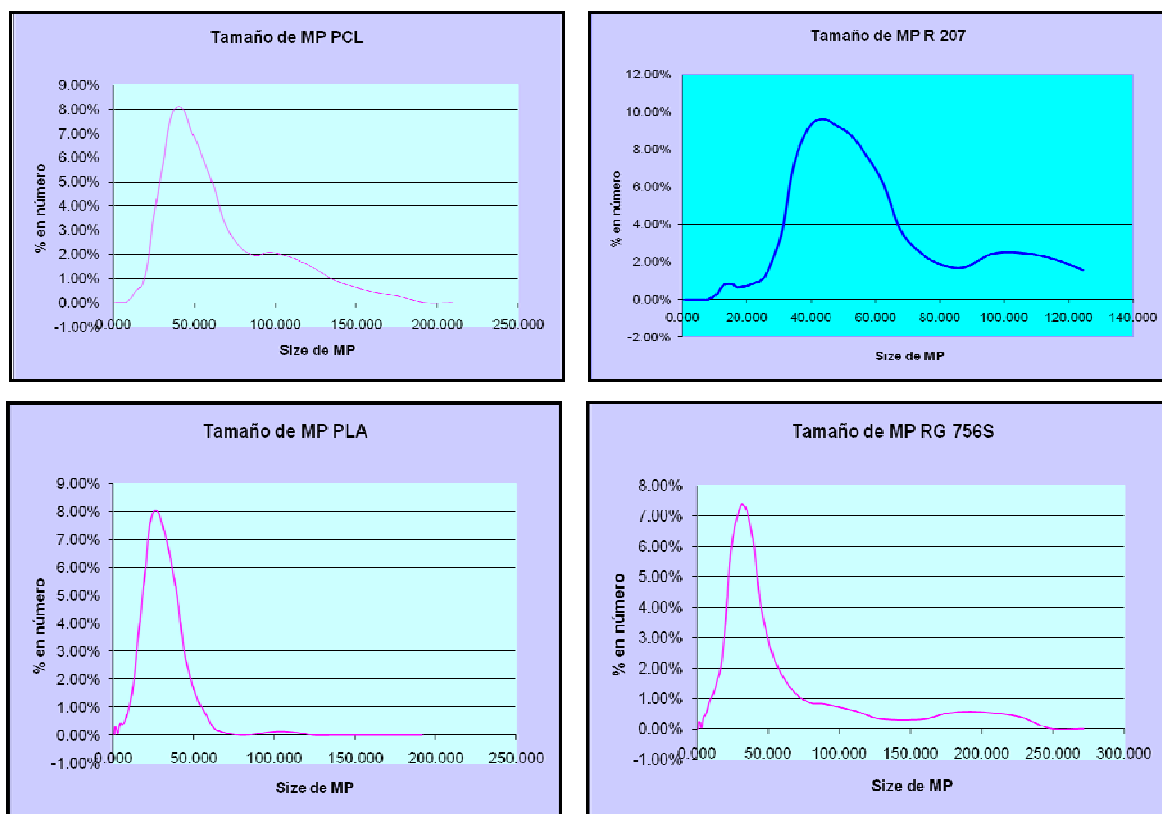


Figura 20. Gráficos obtenidos con los valores resultantes del análisis de tamaño de MP.

Polímero	mv (d)	sd
PLA (R104)	23,44	16,47
PLA (R207S)	48,94	17,22
PLCL(80/20)	26,67	11,73
PCL	48,24	20,66
PLGA (RG504)	101,7	102,7
PLGA (RG756S)	38,24	17,37

Tabla 3. Polímeros con sus respectivos (d) y (sd).

En la tabla anterior, se muestra los polímeros trabajados con sus respectivos: mv, sd. El diámetro estadístico promedio de las micropartículas obtenidas es 47,87. Por tanto, todas las MP presentaron un tamaño adecuado para su administración parenteral mediante inyección subcutánea.

IV.5.3. Determinación del rendimiento del proceso de encapsulación:

En la tabla 4, se muestra los rendimientos obtenidos con cada uno de los polímeros trabajados, se obtienen lotes de MP con rendimientos promedios del proceso comprendidos entre un 73% y 92%. Por lo tanto, los valores de rendimiento obtenidos con algunos polímeros desaconsejan su utilización, aunque el aspecto de las MP obtenidas sea adecuado.

POLÍMERO	RENDIMIENTO PROMEDIO
RG502	86%
PCL	92%
R104	83%
R207S	81%
RG504	90%
RG756S	75%
PLA-PCL (80/20)	73%

Tabla 4. Rendimiento del proceso con cada uno de los polímeros.

IV.5.4. Determinación de la cantidad de fármaco encapsulado (carga):

La figura 21, muestra la cantidad de fármaco hidrosoluble encapsulado según el polímero empleado.

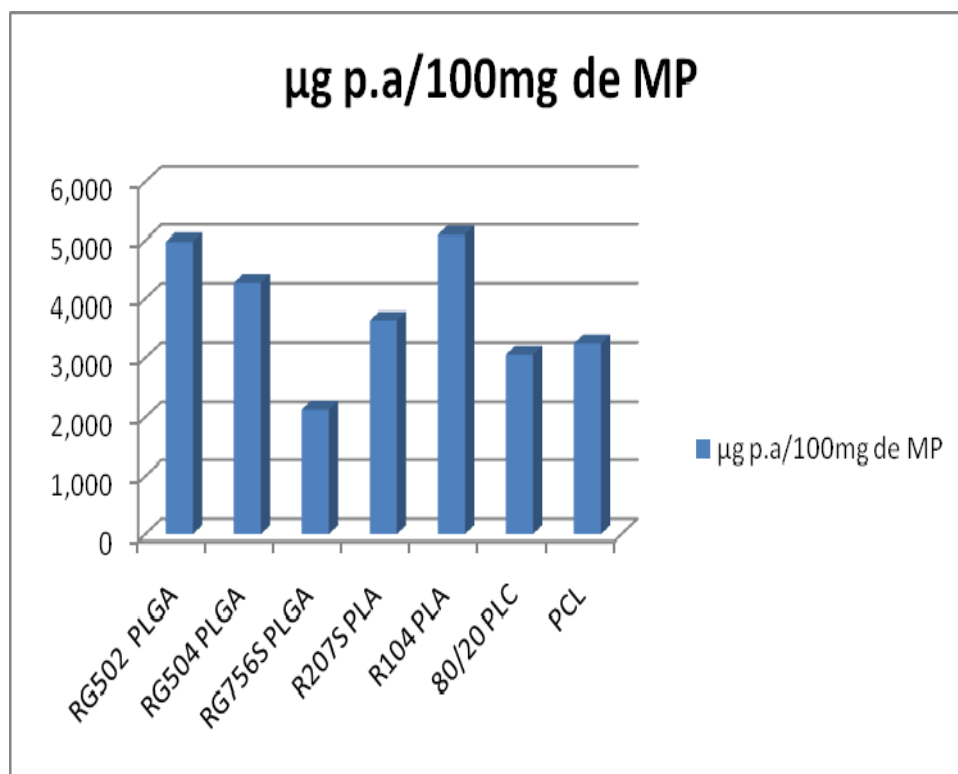


Figura 21. Cantidad de fármaco en las MP.

Se calcula para cada polímero, la cantidad de MP que contiene una dosis semanal de fármaco. Sólo con 3 polímeros de los 7 estudiados se consigue que esta cantidad de MP se pueda suspender en 2mL: **PLGA 50/50 (RG 502), PLGA 50/50 (RG504), PLA (R104).**

IV.5.5 Determinación del ensayo de cesión in vitro:

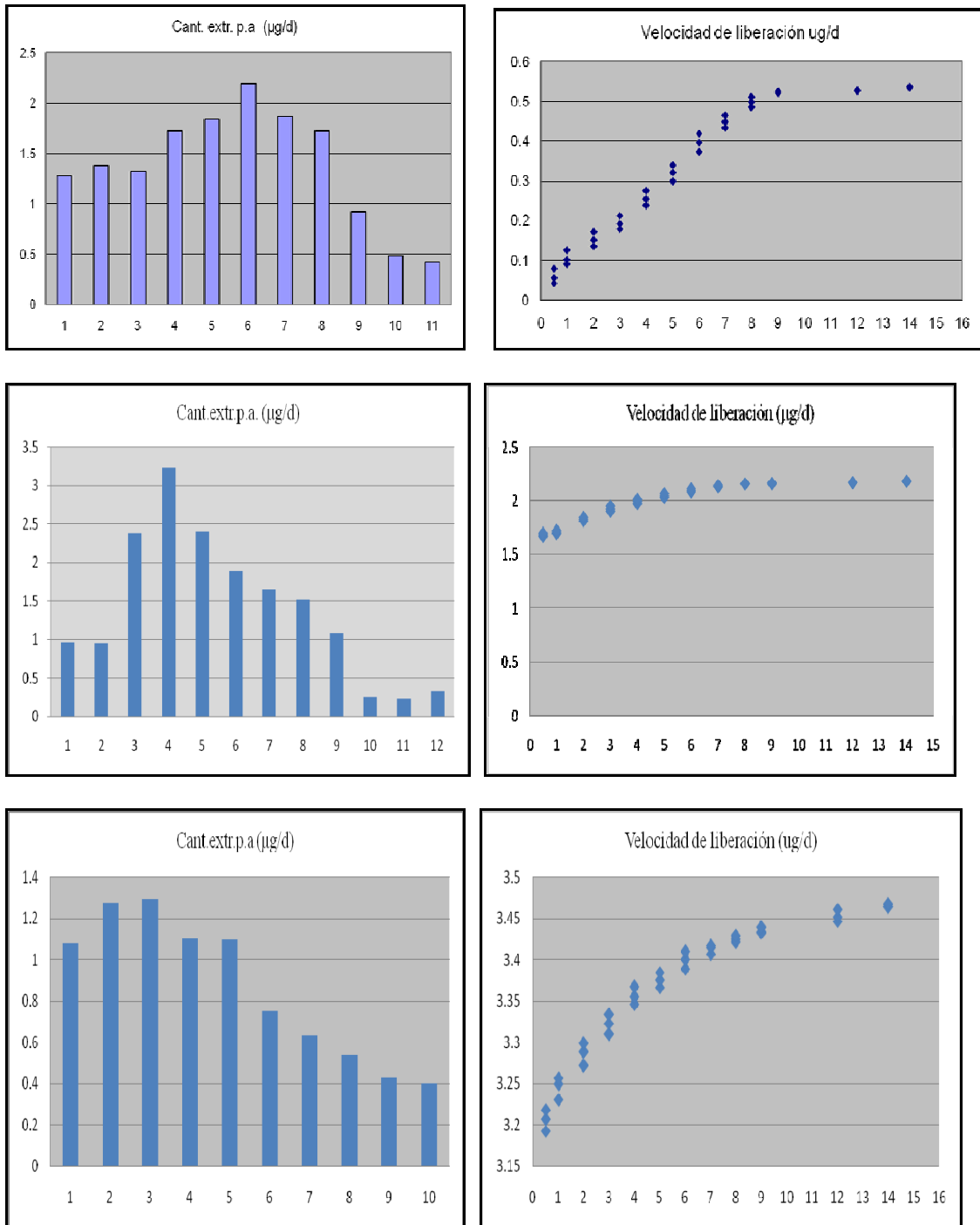
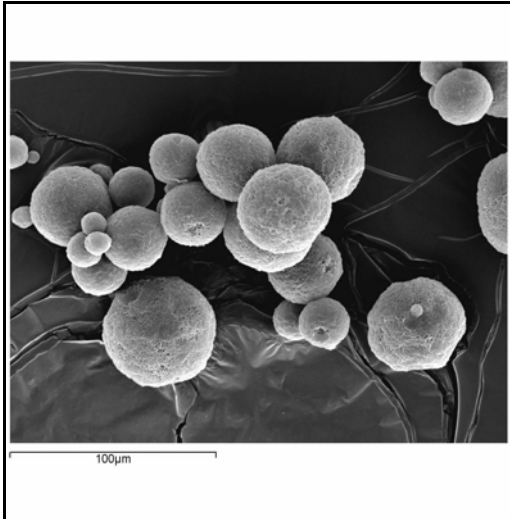
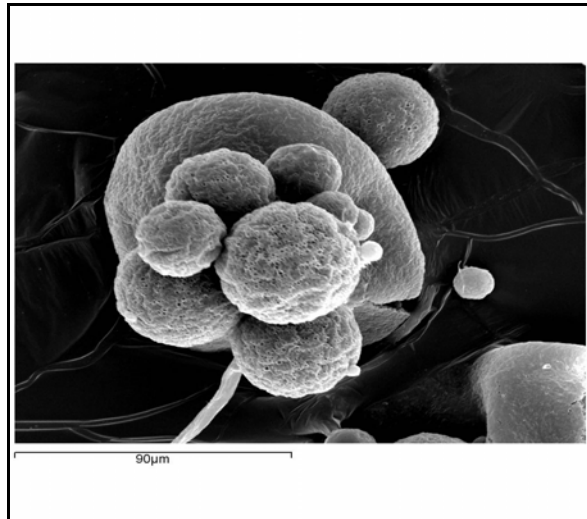


Figura 22. Gráficas de la velocidad de liberación del fármaco con los polímeros: PLGA 50/50 (RG502), PLGA 50/50 (RG504) y PLA (R104), respectivamente.

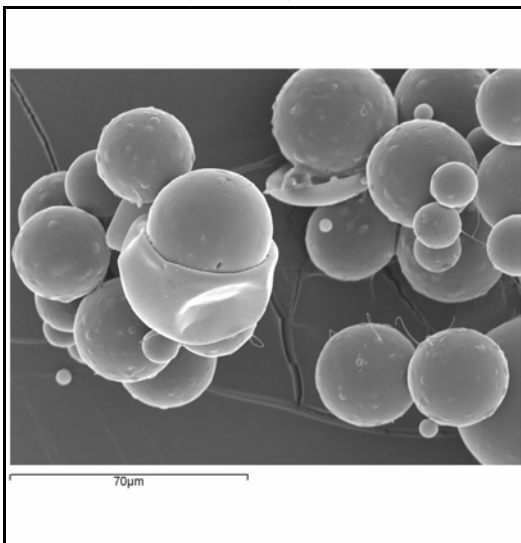
El mecanismo de liberación del fármaco es principalmente por difusión según el aspecto de las MP después del ensayo de cesión (Figura 23).



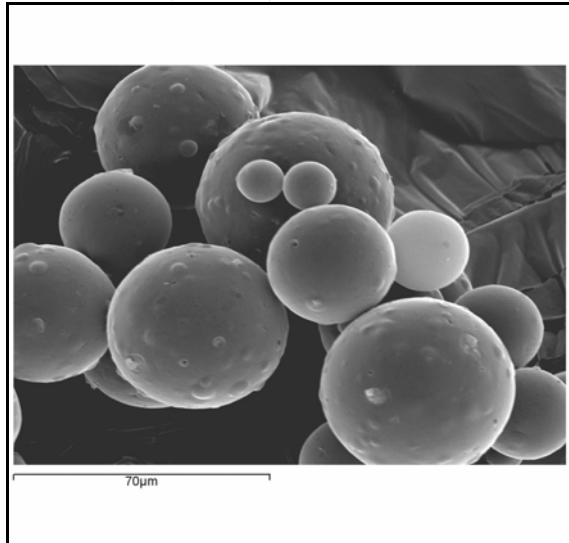
PLGA 50/50 (RG504)



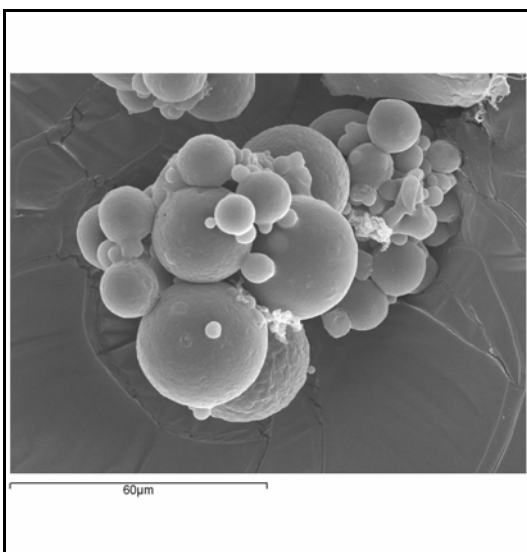
PLGA 50/50 (RG504)



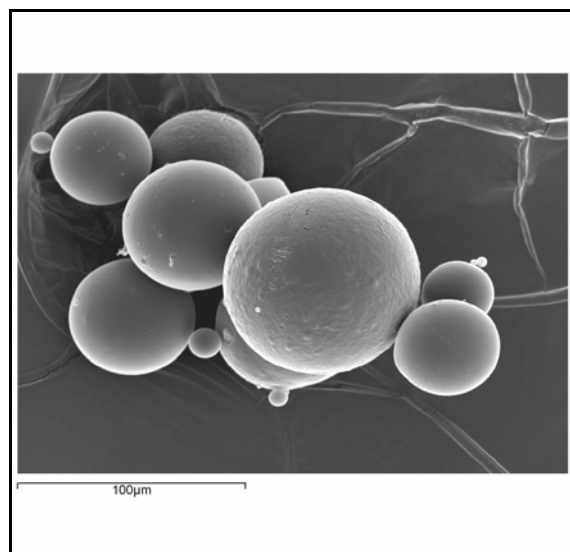
PLGA 75/25 (RG756S) X 500



PLGA 75/25 (RG756S) X 800



PLGA 50/50 (RG502)



PLGA 50/50 (RG502)

Figura 23. MP tras el ensayo de cesión “in vitro”.

V.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS:

- Los lotes de las micropartículas I (MP Blancas), nos permitieron demostrar la validez de los Biopolímeros para obtener micropartículas por el método de la doble emulsión (A₁/O/A₂)- evaporación del solvente, aunque los valores de rendimiento del proceso de microencapsulación y el aspecto de las micropartículas no son óptimos.
- Los lotes de las micropartículas I (MP Blancas), elaboradas por el método de la doble emulsión (A₁/O/A₂) – evaporación del solvente convencional, nos permitieron evaluar el rendimiento del proceso de microencapsulación y el aspecto de las micropartículas, para después con los resultados obtenidos hacer una simplificación del método tecnológico buscando minimizar las pérdidas y mejorar el rendimiento del proceso.
- Simplificando el método de microencapsulación elaborando las MP II, se consigue aumentar el rendimiento del proceso, pero para intentar mejorarlo se incluye una modificación en el método y se elaboran las MP III. Las MP IV y las MP V, nos permitieron evaluar el método y tiempo de evaporación del solvente, para luego optimizar el método de elaboración de las micropartículas conteniendo un fármaco hidrosoluble.
- El método optimizado para elaborar micropartículas cargadas se probó con un solo polímero, antes de elaborar lotes con todos los polímeros estudiados.
- Para garantizar la eliminación total de los solventes empleados en la elaboración de las MP, visto que son para administración parenteral, debe realizarse el análisis de impurezas orgánicas volátiles por cromatografía de gases.

V.I.- CONCLUSIONES:

1.- En general, con todos los Biopolímeros empleados se pueden obtener micropartículas (MP) por el método de la doble emulsión ($A_1/O/A_2$) – evaporación del solvente. El aspecto de las MP y el rendimiento del proceso de encapsulación son muy distintos según el material polimérico transportador implicado. De hecho, para algunos polímeros y copolímeros se obtienen valores de rendimiento del proceso que desaconsejan su uso, aunque el aspecto de las micropartículas obtenidas sea adecuado.

2.- De todas las posibles variables tecnológicas y de formulación que pueden modificar el aspecto de las MP, se han evaluado experimentalmente las siguientes: tipo y velocidad de agitación para la obtención de las emulsiones, concentración del polímero, tipo y volumen del solvente orgánico. Se ha observado que todas ellas influyen en el aspecto de las MP obtenidas, siendo la concentración de tensioactivo en la fase externa acuosa y el proceso de extracción-evaporación del solvente influyen de forma significativa en el aspecto de las MP obtenidas.

3.- Con todos los polímeros estudiados se obtuvieron MP de morfología esférica. El aspecto de la superficie de las MP, en algunos casos fue liso y en otros rugosos, según el material polimérico. Todas las MP presentaron un tamaño adecuado para su administración parenteral mediante una inyección subcutánea.

4.- Sólo con 3 polímeros de los 7 estudiados se consiguieron MP con una carga en fármaco adecuada para una administración cómoda de una dosis semanal. Las MP de estos 3 polímeros fueron seleccionadas para realizar el ensayo de cesión “in Vitro”.

La velocidad de liberación del fármaco fue diferente según el material controlador empleado. En todos los casos, se consiguió una liberación del fármaco hidrosoluble durante una semana.

5.- Los lotes de MP obtenidos en este trabajo han sido cuidadosamente elaborados siguiendo todas las exigencias previstas dentro del desarrollo galénico, pero para elaborar lotes pilotos y luego a gran escala se debería incluir la etapa de esterilización de las MP dentro de la elaboración puesto que son para uso parenteral.

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1)- Ramos D. y col. Revista Cubana Farmacéutica. 2000, 34 (1): 70-7.

- 2)- Bautista L. y col. En: Libro Actas II Congreso Nacional Investigación Alumnos Pregrado Ciencias de la Salud. Madrid, Abril 2008.

- 3)- Sánchez C, Molina M. Plásticos Aplicados en Medicina. Primera Edición (2004).

- 4)- López G. Diseño de formas farmacéuticas líquidas de liberación modificada para el tratamiento del dolor. (Tesis para optar al Título de Doctor en Farmacia). Granada - España: Universidad de Granada; 2008.

- 5)- Benítez C. y col. En: Libro Actas II Congreso Nacional Investigación Alumno Pregrado Ciencias de la Salud. Madrid, Abril 2008.

- 6)- Sáez V. y col. Revista Iberoamericana de Polímeros. 2003, 4(3): 69-88.

- 7)- Sauvage J, Bautista L. Nuevas estrategias para el tratamiento de la drogación: Microesferas de Naloxona. III Jornada sobre Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, Mayo 2008.

- 8) - Brandrup, J., Immergut, E.H., AND Rilke, E.A. Polymer handbook (4th.ed.).

- 9) - <http://www.absorbables.com/index.htm> (2008).

- 10) - <http://www.sigmaaldrich.com/spain.html> (2008).
- 11) - http://www.boehringer-ingenelheim.com/corporate/ic/pharmachem/products/product_range.asp
(2008).
- 12) - <http://www.portalesmedicos.com/imagenes/publicaciones>.
- 13)- Bautista L. y col. En: Libro Actas Congreso Organizado por la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica. Pamplona, Febrero 2009.
- 14) - Zhu K, Jiang H, Wang J. Preparation and characterization of hCG – loaded polylactide or poly (lactide- co- glycolide) microspheres using a modified w/o/w emulsion solvent evaporation technique. *J. Microencapsulation*. 2001, 18 (2): 247 -260.
- 15) - Ozalp Y, Ozdemir N, Kocagoz S and Hasircis V. Controlled release of vancomycin from biodegradable microcapsules. *J. Microencapsulation*. 2001, 18 (1): 89 – 110.
- 16) - Majella E, Fiona S, Owen I. Influence of post – emulsification drying processes on the microencapsulation of Human Serum Albumin. *I. J. Pharmaceutics*. 2006, 307: 16-22.
- 17) - M.k. Yeht, J.L. Chenj and C.H. Chiangj. “In vivo and in vitro characteristics for insulin Loaded PLA microparticles prepared by w/o/w solvent evaporation method with electrolytes in the continuous phase”. *J. Microencapsulation*. 2004, 21:719-728.
- 18) - Lareo M, Torres A.I., Gil M.E. *J. Sep. Sci*; 2005, **28**:16, 2086-2088.

- 19) - Hino T, Shimabayashi S, Tanaka M and Okochi H. Improvement of encapsulation efficiency of water-in-oil-in-water emulsion with hypertonic inner aqueous phase. *J. Microencapsulation*. 2001, 8 (1): 19-28.
- 20) - Vivek K, Harivardhan L and Murthy R. Comparative study of some Biodegradable Polymers on the entrapment efficiency and release behaviour of etoposide from microspheres. *Pharmaceutical Development and Tecnology*. 2007, 12:79-88.
- 21) - Fuminori I, Fujimori H, Makino K. Factors affecting the loading efficiency of water – soluble drugs in PLGA microspheres. *Science Direct, colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2008, 61:25-29.
- 22) - Jaraswekin S, Prakongpan S, Bodmeier R. Effect of poly (lactide- co- glycolide) molecular weight on the release of dexamethasone sodium phosphate from microparticles. *J. Microencapsulation*. 2007; 24(2): 117-128.
- 23) - Capan Y, Woo B, Gebrekidan S, Ahmed S, Deluca P. Influence of formulation parameters on the characteristics of poly (D,L – lactide – co- glycolide) microspheres containing poly (L – lysine) complexed plasmid DNA. *Journal of controlled release*. 2000, 60: 279 – 286.
- 24) - Mao Shirui, Shi Y, Li L, Xu J. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly (D,L – lactide- co- glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *E.J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008, 68: 214-223.

- 25) - Luan X, Skupin M, Siepmann J and Bodmeier R. Key parameters affecting the initial release (burst) and encapsulation efficiency of peptide- containing poly (lactide - co – glycolide) microparticles. I. J. Pharmaceutics. 2006, 324: 168 – 175.
- 26) - Kumar G, Ashim K. Effect of lactide / glycolide ratio on the in vitro release of ganciclovir and its lipophilic prodrug (GCV- monobutyrate) from PLGA microspheres. I.J. Pharmaceutics. 2007, 338: 133-141.
- 27) - Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, Krenzlin S. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA - based microparticles. I. j. Pharmaceutics. 2006, 314: 198-206.
- 28) - Graves R, Pamujula S, Moiseyev R, Freeman T. Effect of different ratios of high and low molecular weight PLGA blend on the characteristics of pentamidine microcapsules. I. J. Pharmaceutics. 2004, 270: 251 -262.
- 29)- José Luis Vila Jato (Editor). Tecnología Farmacéutica. Vol. II: Nuevas Formas de Administración de Medicamentos. Ed. Síntesis. Pág. 422 - 430. (2001)

ANEXOS

1.-MÉTODO DE FILTRADO DE LAS MICROPARTÍCULAS:

Las micropartículas fueron filtradas mediante bomba de vacío (Equipo de filtración con bomba de vacío. Marca BÜCHI. Modelo Vacuum Controller V-800). En el proceso de filtración se emplea 200mL de agua desionizada para el proceso de lavado de las MP. Es importante observar la solución que se obtiene luego del filtrado de las MP, porque una inadecuada manipulación, puede dañarse el filtro y notarse la presencia de MP en la solución filtrada. Debido a los solventes empleados, se realizó una selección experimental del filtro a utilizar con el equipo de filtración. Después de hacer varios ensayos y basándonos en referencias científicas, se empleó filtros de Nitrocelulosa (5 μm SMWP), Millipore, España. $\text{Ø} = 45\text{mm}$. Al utilizar este filtro se obtiene un proceso de filtración y lavado de las MP más rápido, menos pérdidas.

2.- SECADO DE LAS MP:

El filtro con la torta obtenido luego del proceso de filtrado y lavado de las micropartículas es colocado en una placa petri, para su posterior secado a temperatura ambiente en zona limpia, libre de contaminación cruzada. Luego en un mortero pequeño especial para MP, se procede a homogenizarlas y guardarlas con su respectiva codificación en envases pequeños de plástico, para su posterior análisis.