

Microesferas biodegradables de poli(D,L-láctico) conteniendo progesterona

Biodegradable microspheres of poly(D,L-lactide) containing progesterone

CHIAPPETTA D^{1*}, LEGASPI MJ¹, NISELMAN V², PASQUALI R¹, GERGIC E¹, RODRÍGUEZ LLIMÓS AC¹, BREGNI C¹

¹Departamento de Tecnología Farmacéutica, ²Departamento de Fisicomatemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956 (1113) Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia: diegochiappetta@yahoo.com.ar

RESUMEN

Se obtuvieron microesferas de poli(D,L-láctico) conteniendo progesterona por medio de una emulsión simple aceite en agua empleando una técnica de evaporación de solvente. Se realizó un experimento con un diseño factorial 2³ para estudiar el efecto de tres variables independientes (cantidad de principio activo, cantidad de polímero y concentración de alcohol polivinílico) sobre las variables dependientes (encapsulación de principio activo y tamaño de partícula). Las tres variables independientes influyeron significativamente sobre la encapsulación de progesterona. En el caso del tamaño de partícula, las variables que ejercieron una influencia significativa fueron la concentración de alcohol polivinílico y la cantidad de polímero. Los estudios de liberación *in vitro* han mostrado que de acuerdo al tamaño de partícula se pueden obtener formulaciones que logran liberar progesterona en pocos días u obtener una liberación sostenida durante 28 días. El estado físico del fármaco se investigó por calorimetría diferencial de barrido. Los estudios muestran que existe una interacción fisicoquímica entre la progesterona y el polímero.

PALABRAS CLAVE: Diseño factorial. Liberación sostenida. Microesferas biodegradables. D,L-PLA. Progesterona.

ABSTRACT

Microspheres of poly(D,L-lactide) containing progesterone were prepared by the solvent evaporation method using a simple oil water emulsion. 2³ factorial design was used to determine the effect of three independent variables (amount of drug, amount of polymer and concentration of polyvinyl alcohol) over the dependent variables (drug content and particle size). The three independent variables influenced significantly over the percentage drug encapsulated. On the other hand, in the particle size case, the variables which produced a significantly influence were the polyvinyl alcohol concentration and the amount of polymer. The in vitro release studies have shown that according to the particle size, it can be obtained formulations which are able to release progesterone in a few days or a sustained release among 28 days. The physical state of drug has been examined by differential scanning calorimetric. The studies indicate that exists a physicochemical interaction between the progesterone and the polymer.

KEY WORDS: Biodegradable microspheres. Factorial design. D,L-PLA. Progesterone. Sustained release.

INTRODUCCIÓN

El control terapéutico de la fertilidad se lleva a cabo principalmente con la administración oral de esteroides. La desventaja de utilizar esta vía de administración se encuentra principalmente en una constante variación en la

INTRODUCTION

The therapeutic fertility control is mainly realized by oral administration of steroids. The disadvantage of the oral route is the requirement of daily ingestion and the subsequent daily variations in blood concentration.

concentración plasmática al ser administrada diariamente.

Por esta razón, existen otros sistemas de liberación tales como implantes (Norplant®)¹ y dispositivos intrauterinos (Progestasert®)², los cuales liberan levonorgestrel y progesterona en forma controlada desde matrices poliméricas no biodegradables.

Resulta de elección utilizar polímeros biodegradables, los cuales presentan una ventaja significativa con respecto a los no biodegradables, por la atoxicidad y biocompatibilidad de sus productos de degradación. Los polímeros biodegradables pueden ser de origen natural o sintético.

Las ventajas de utilizar polímeros biodegradables naturales se relacionan con su bajo costo, su biocompatibilidad y la buena solubilidad en medios acuosos. A pesar de presentar estas ventajas, los polímeros naturales ven limitado su uso debido a la variabilidad en su composición y peso molecular entre lotes. En contraste a esto, los polímeros biodegradables sintéticos poseen una alta reproducibilidad con respecto a la relación de monómeros y al peso molecular. Esto permite controlar y predecir las cinéticas de degradación de los polímeros³.

Durante las últimas dos décadas, se ha incrementado el desarrollo de sistemas de liberación de anticonceptivos con polímeros biodegradables sintéticos debido a estar libres de los problemas asociados a los polímeros naturales. Implantes, films y microesferas han sido preparados con polímeros biodegradables sintéticos como poli(láctico), poli(láctico-co-glicólico) y poli(e-caprolactona)⁴⁻¹².

La aplicación de un diseño estadístico para optimizar el desarrollo de formulaciones farmacéuticas podría proveer una metodología económica y eficiente. El diseño factorial es una herramienta estadística que nos permite obtener la información necesaria para entender la relación entre las variables controlables (independientes) y las variables de *performance* (dependientes). Esta técnica ha sido comúnmente empleada en el desarrollo de comprimidos¹³⁻¹⁵, microcápsulas^{16,17} y suspensiones¹⁸.

El objetivo de este trabajo es obtener un sistema microparticulado biodegradable capaz de liberar progesterona (PRG) en forma sostenida para lo cual, se ha utilizado un diseño

For this reason, there are others controlled release systems such as implants (Norplant®)¹ and intrauterine device (Progestasert®)², which deliver progesterone and levonorgestrel from non-biodegradable polymer matrices.

Because of the atotoxicity and biocompatibility of its degradation products it is better to use biodegradable polymers, which present a significantly advantage in relation with non-biodegradable. The biodegradable polymers can be from a natural or a synthetic origin.

The advantages of using natural biodegradable polymers are based on its low cost, its biocompatibility and its solubility in aqueous medium. Although these advantages, the natural polymers have a limited use due to the variability in its composition and molecular weight between batches. On the other hand, synthetic biodegradable polymers have a high reproducibility in relation with the monomers ratio and molecular weight. This allows to control and predict the degradation kinetics of polymers³.

During the last two decades, synthetic biodegradable polymers have increased their usage as steroid hormones delivery systems. These polymers do not have the problems associated with natural polymers. Implantable rods, films and microspheres have been prepared from a number of synthetic biodegradable polymers such as poly(lactide), poly(lactide-co-glicolide) and poly(e-caprolactone)⁴⁻¹².

The application of a statistical design could provide an economic and efficient methodology to enhance the pharmaceutical formulation development. A factorial design is a statistical tool which is able to give the necessary information to understand the relationship between independent and dependent variables. This technique has been usually employed in tablet¹³⁻¹⁵, microcapsule^{16,17} and suspension¹⁸ developments.

The goal in this work is to obtain a micro-particle biodegradable system enable to liberate PRG in a sustained way. For this reason, a factorial design 2³ has been followed to optimise the development process and to improve the pharmacotechnical features of the formulations. Besides, *in vitro* release was studied and also the pharmaceutical active physical state, in a qualitative way, through differential scanning calorimetry (DSC).

factorial 2^3 para optimizar el proceso de desarrollo y mejorar las características farmacotécnicas de las formulaciones. Además, se estudió la liberación *in vitro* y el estado físico del principio activo, en forma cualitativa, por calorimetría diferencial de barrido (CDB).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Progesterona, 101,0 % (Sigma); poli(D,L-láctico) (D,L-PLA) (M_w 90.000-120.000) (Sigma); alcohol polivinílico (PVA) (Riedel-de Haën); cloruro de metileno (Anedra[®]) grado HPLC; fosfato de potasio monobásico (Parafarm[®]). Todos los materiales fueron utilizados como se recibieron.

Diseño factorial de los experimentos

Los experimentos fueron realizados siguiendo un diseño factorial 2^3 . En este diseño, las variables independientes son cantidad de principio activo (X_1), cantidad de polímero (X_2) y concentración de PVA (X_3). La encapsulación de principio activo (Y_1) y el tamaño de partícula (Y_2) son las variables dependientes. Las variables independientes y los niveles utilizados en la preparación de las microesferas se encuentran detallados en la Tabla 1. El objetivo de realizar un diseño factorial se centra en el hecho de poder estudiar el efecto de las variables y sus interacciones utilizando una herramienta estadística adecuada. Todas las formulaciones fueron preparadas por triplicado. Los datos fueron evaluados utilizando el programa computacional S-Plus 2000[®].

MATERIAL AND METHODS

Materials

Progesterone, 101.0 % (Sigma); poly(D,L-lactide) (D,L-PLA) (M_w 90.000-120.000) (Sigma); polyvinyl alcohol (PVA) (Riedel-de Haën); dichloromethane (Anedra[®]) grade HPLC; potassium phosphate monobasic (Parafarm[®]). All materials were used as received.

Factorial design of experiments

The experiments were performed with a 2^3 factorial design. In this design, the independent variables are amount of drugs (X_1), amount of polymer (X_2) and concentration of PVA (X_3). The drug content (Y_1) and the particle size (Y_2) are the dependent variables. The independent variables and the levels used in the preparation of the microspheres are shown in Table 1. The purpose of using a full factorial experimental design was to conduct a comprehensive study of the effect of the process parameters and their interaction using suitable statistical tool. All the batches were prepared in triplicate. The data were evaluated using the computer program S-Plus 2000[®].

TABLA 1. Variables independientes y sus niveles.
TABLE 1. The independent variables and their levels.

Variable independiente <i>Independent variable</i>	Nivel bajo <i>Low level</i>	Nivel alto <i>High level</i>
Cantidad de principio activo (X_1) <i>Amount of drug (X_1)</i>	20 mg	40 mg
Cantidad de polímero (X_2) <i>Amount of polymer (X_2)</i>	100 mg	200 mg
Concentración de PVA (X_3) <i>Concentration of PVA (X_3)</i>	0,5 % P/V	2,0 % P/V

Preparación de las microesferas

Las microesferas de D,L-PLA conteniendo PRG fueron preparadas por medio de una emulsión simple aceite en agua (O/A) empleando una técnica de evaporación de solvente. Una cantidad conocida de polímero (D,L-PLA) fue disuelta en 3 ml de cloruro de metileno. A esta solución se agregó una cantidad conocida de progesterona (Tabla 2). La solución de polímero y principio activo (fase orgánica) fue agregada bajo agitación en 60 ml de una solución acuosa de PVA. La emulsión O/A así obtenida se mantuvo bajo agitación durante 3 horas hasta la evaporación del cloruro de metileno. Las microesferas fueron recuperadas por filtración y secadas a temperatura ambiente en desecador durante 24 horas. Las diferentes formulaciones desarrolladas se detallan en la Tabla 2.

Preparation of microspheres

D,L-PLA microspheres containing PRG were prepared by the solvent evaporation method using a simple oil water emulsion (O/W). A known amount of polymer (D,L-PLA) was dissolved in 3 ml the dichloromethane. A known amount of progesterone (Table 2) was added to this solution. The solution of polymer and drug (oil phase) was added under stirring into a 60 ml of PVA solution. The O/W emulsion kept under stirring for 3 hours until the dichloromethane evaporation. The microspheres were recovered by filtration and dried in a desiccator at room temperature for 24 hours. The different developed formulations are detailed in Table 2.

TABLA 2. Formulaciones de microesferas de D,L-PLA conteniendo progesterona.
TABLE 2. The contents of D,L-PLA microspheres containing progesterone.

Formulación <i>Formulation</i>	Cantidad de principio activo (mg) <i>Amount of drug (mg)</i>	Cantidad de polímero (mg) <i>Amount of polymer (mg)</i>	Concentración de PVA (% P/V) <i>Concentration of PVA (% W/V)</i>
F1	20	100	0,5
F2	40	100	0,5
F3	20	100	2,0
F4	40	100	2,0
F5	20	200	0,5
F6	40	200	0,5
F7	20	200	2,0
F8	40	200	2,0

Determinación del contenido de principio activo

Aproximadamente 20,0 mg de microesferas fueron exactamente pesadas y diluidas a 100 ml utilizando cloruro de metileno. La solución resultante se filtró por membrana de nylon (0,45 mm) y luego de diluciones apropiadas la muestra se leyó espectrofotométricamente (CARY [1E] UV – Visible Spectrophotometer Varian) a 239 nm. Todas las determinaciones se realizaron utilizando como blanco microesferas sin PRG.

Morfología y distribución del tamaño de partícula

Las características morfológicas de las microesferas fueron estudiadas utilizando un microscopio óptico trinocular (Arcano XSZ-107 E) con cámara fotográfica (Seagull DF-300s).

La determinación del tamaño de partícula se efectuó mediante microscopía óptica (Arcano XSZ-107 E), para lo cual se determinaron los diámetros de 300 partículas¹⁹. La distribución de tamaño de las microesferas fue ajustada en función del porcentaje de frecuencia.

Estudios de liberación in vitro

El estudio de liberación *in vitro* se llevó a cabo en condiciones estáticas. El ensayo se efectuó a una temperatura de $37 \pm 0,5$ °C, utilizando como medio de disolución 50 ml de una solución de buffer fosfato pH 7,4 con etanol 20 % V/V para mantener las condiciones sink del experimento.

Las muestras fueron analizadas mediante espectrofotometría a 239 nm (CARY [1E] UV – Visible Spectrophotometer Varian). En cada caso, los resultados son el promedio de tres determinaciones. Los datos experimentales fueron evaluados cinéticamente utilizando un programa computacional (SigmaPlot 2001).

Determination of drug content

Around 20.0 mg microspheres were accurately weighed and diluted 100 ml using dichloromethane. The sample was filtrated through nylon membrane (0.45 mm) and after appropriate dilutions, the sample was assayed spectrophotometrically (CARY [1E] UV – Visible Spectrophotometer Varian) at 239 nm. All the determinations were realized using microspheres without PRG as blank.

Morphology and particle size distribution

The microspheres morphological characteristics were studied using an optical microscope trinocular (Arcano XSZ-107 E) with photographic camera (Seagull DF-300s).

The particle size was carried out by optical microscopy (Arcano XSZ-107 E), measuring the diameter of 300 particles¹⁹. The size distribution of microspheres was plotted against their percentage frequency.

In vitro release studies

In vitro release study was carried out under static conditions. The test was realized at 37 ± 0.5 °C, using 50 ml of phosphate buffer solution pH 7.4 with ethanol 20 % V/V to keep the sink conditions of the experiment.

Samples were analyzed by spectrophotometry at 239 nm (CARY [1E] UV – Visible Spectrophotometer Varian). In each case, the results are the average of three determinations. The release data were evaluated kinetically using a computer program (SigmaPlot 2001).

Differential scanning calorimetric (DSC) studies

The samples were analyzed in a differential scanning calorimeter Shimadzu DSC-50. About 2 to 3 mg of the sample was weighted in an aluminium pan and crimped non-hermetically. The system was calibrated with indium and fenantreno and heated from 25 to 250 °C at a rate of 5 °C per minute. Differential scanning calorimetry studies were able to qualita-

Estudios de calorimetría diferencial de barrido (CDB)

Las muestras fueron analizadas en un calorímetro diferencial de barrido Shimadzu DSC-50. En una cápsula de aluminio se colocaron de 2 a 3 mg de la muestra sellándose no herméticamente. El sistema fue calibrado con indio y fenantreno. Se calentó de 25 a 250 °C a una velocidad de 5 °C por minuto. Los estudios de calorimetría diferencial de barrido permitieron determinar cualitativamente el estado físico de la PRG en las formulaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La PRG es el compuesto más atractivo para la regulación de la fertilidad y el tratamiento de la infertilidad. Se encuentra en el organismo en altas concentraciones y, por lo tanto, no posee problemas de toxicidad como las progestinas sintéticas. Sin embargo, la PRG posee una vida media corta y cuando se administra por vía oral no es activa, excepto en altas dosis²⁰. Por estas razones, la progesterona resulta un buen modelo de fármaco para la microencapsulación y la liberación parenteral controlada.

Se obtuvieron microesferas de D,L-PLA con PRG por medio de una emulsión O/A empleando una técnica de evaporación de solvente. Se lograron porcentajes de encapsulación que van desde $(8,7 \pm 0,1)\%$ P/P a $(25,5 \pm 0,2)\%$ P/P como se detalla en la Tabla 3.

Las partículas resultantes son de forma esférica (*Figura 1*) con un tamaño comprendido entre $(12,4 \pm 11,1) \mu\text{m}$ y $(91,5 \pm 28,9) \mu\text{m}$ para las diferentes formulaciones desarrolladas (*Tabla 3*).

tivamente determine the physical state of the PRG in the formulations.

RESULTS AND DISCUSSION

Progesterone is the most attractive compound for fertility regulation and treatment of infertility because it occurs in high concentrations in the body and therefore does not pose any toxicity problems unlike synthetic progestins. However, PRG has a very short biological half life and is not orally active except in high doses²⁰. This is why, the PRG is an appropriate candidate for the microencapsulation and controlled parenteral delivery.

D,L-PLA microspheres containing PRG were formed by the solvent evaporation method using a simple oil water emulsion. Percentages of encapsulation which go from $(8.7 \pm 0.1)\%$ W/W to $(25.5 \pm 0.2)\%$ W/W were obtained, as detailed in Table 3.

The resulting particles were spherical (*Figure 1*) with a size included between $(12.4 \pm 11.1) \mu\text{m}$ and $(91.5 \pm 28.9) \mu\text{m}$ for the different formulations developed (*Table 3*).

FIGURA 1. Microfotografía de microesferas de D,L-PLA con progesterona (100X).
FIGURE 1. Photomicrograph of D,L-PLA microspheres containing progesterone (100X).

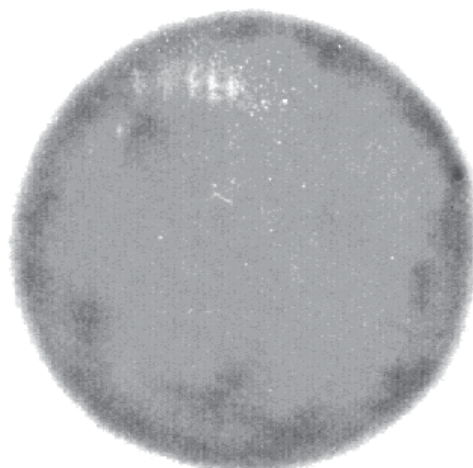


TABLE 3. Characteristics of microspheres.
TABLA 3. Características de las microesferas.

Formulación <i>Formulation</i>	Encapsulación de principio activo (% P/P) <i>Drug content (% W/W)</i>	Tamaño de partícula (mm) media ± D.S. <i>Particle size (mm) average ± SD</i>
F1	12,2 ± 0,2	56,9 ± 17,4
F2	21,1 ± 0,2	58,5 ± 22,1
F3	14,2 ± 0,2	13,2 ± 10,7
F4	24,5 ± 0,2	12,4 ± 11,1
F5	8,7 ± 0,1	91,5 ± 28,9
F6	16,1 ± 0,2	90,5 ± 30,8
F7	8,7 ± 0,1	12,4 ± 11,8
F8	16,3 ± 0,2	12,4 ± 13,0

Evaluación del diseño factorial

Utilizando un análisis de la varianza (ANOVA), se evaluó el efecto de las variables independientes (X_1 , X_2 y X_3) sobre el tamaño de partícula y encapsulación de principio activo. Se aplicó una regresión múltiple a las variables dependientes en función de las variables independientes. En el caso de la encapsulación de principio activo se obtuvo la siguiente ecuación:

Factorial design evaluation

The effect of the independent variables (X_1 , X_2 and X_3) on particle size and drug content was evaluated with analysis of variance (ANOVA). Multiple regression is applied to dependent variables against independent variables. In the case of drug content the following equation was obtained:

$$y = 4,9167 + 0,4725X_1 - 0,0175X_2 + 0,8667X_3 - 0,0005X_1X_2 + 0,09X_1X_3 - 0,005X_2X_3 - 0,0004X_1X_2X_3$$

$$R^2 = 0,9971$$

$$\text{Adj. } R^2 = 0,9945$$

Para el tamaño de partícula, la ecuación obtenida es la siguiente:

$$y = 18,883 + 0,309X_1 + 0,502X_2 - 1,667X_3 - 0,002X_1X_2 - 0,193X_1X_3 - 0,259X_2X_3 + 0,001X_1X_2X_3$$

$$R^2 = 0,9989$$

$$\text{Adj. } R^2 = 0,9979$$

Los resultados del análisis de la varianza indican que las tres variables independientes (X_1 , X_2 y X_3) han influido significativamente en la encapsulación de principio activo. De las tres variables estudiadas, la cantidad de principio activo (X_1) fue la variable que más influyó como se observa en la figura 2B y 2C. Esto podría deberse a la mayor cantidad de PRG disponible para su encapsulación. La concentración de PVA (X_3) es la variable que menor influencia ejerció sobre la encapsulación de PRG (Figura 2A y 2C). A mayor concentración de PVA se produce un aumento en la viscosidad de la fase externa de la emulsión O/A logrando una mayor encapsulación de PRG. Este aumento en la viscosidad impediría el pasaje de principio activo a la fase externa. Con respecto a la cantidad de polímero (X_2) empleado, cuanto menos se utilice en las formulaciones mayor será la encapsulación. A medida que la relación polímero/principio activo se hace más pequeña aumenta la cantidad de fármaco disponible por partícula.

$$y = 4,9167 + 0,4725X_1 - 0,0175X_2 + 0,8667X_3 - 0,0005X_1X_2 + 0,09X_1X_3 - 0,005X_2X_3 - 0,0004X_1X_2X_3$$

$$R^2 = 0,9971$$

$$\text{Adj. } R^2 = 0,9945$$

For the particle size, the obtained equation is the following:

$$y = 18,883 + 0,309X_1 + 0,502X_2 - 1,667X_3 - 0,002X_1X_2 - 0,193X_1X_3 - 0,259X_2X_3 + 0,001X_1X_2X_3$$

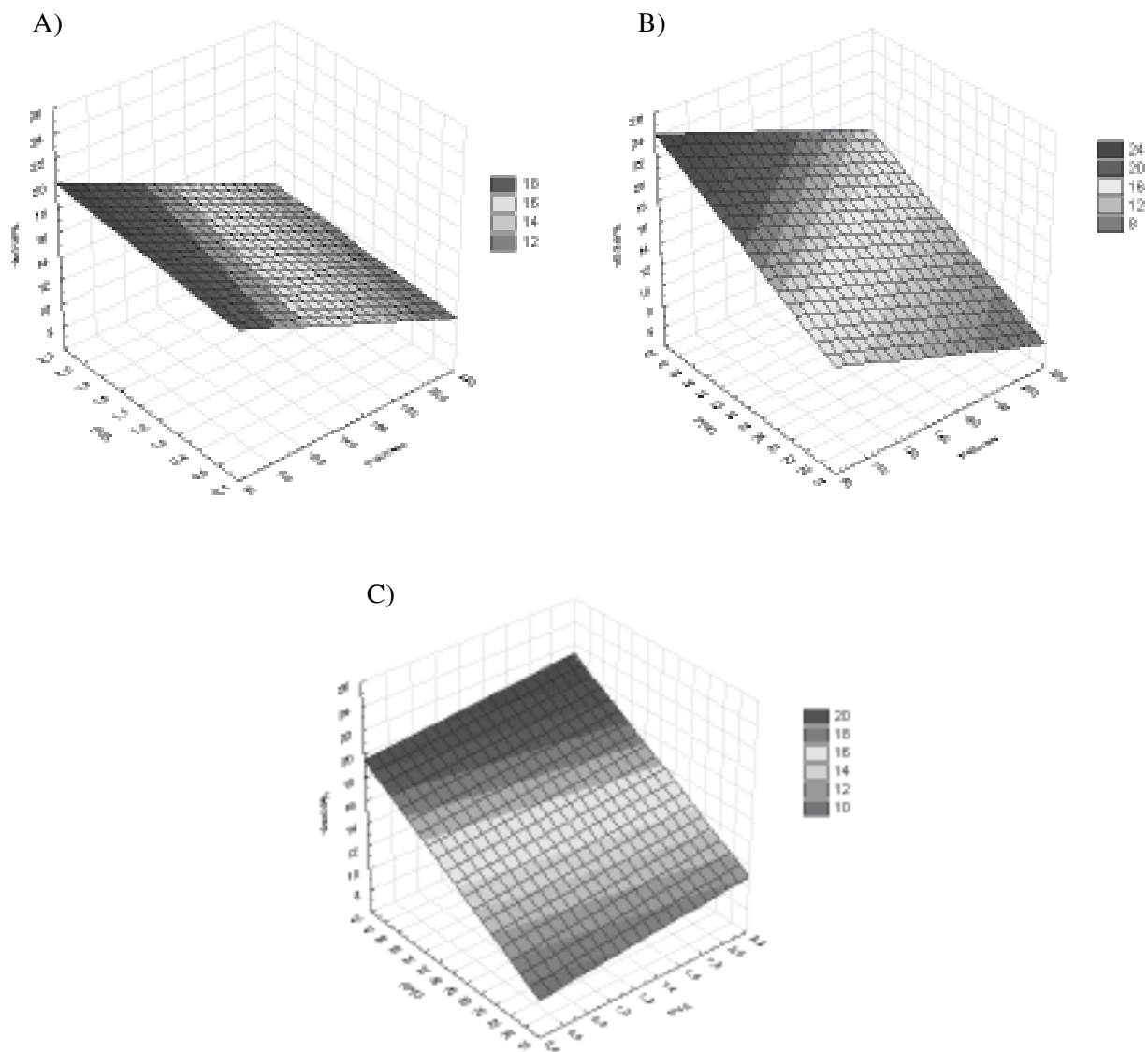
$$R^2 = 0,9989$$

$$\text{Adj. } R^2 = 0,9979$$

The results of analysis of variance indicate that the three independent variables (X_1 , X_2 and X_3) have influenced significantly on the drug content. The most effective variable was the amount of drug (X_1) as it can be observed in figure 2B and 2C; this may be caused by a higher amount of available PRG for its entrapment. The PVA concentration (X_3) was the least effective variable over the PRG encapsulation (Figure 2A and 2C). A viscosity increment of the external phase (aqueous) is produced by a higher concentration of PVA, getting a greater PRG encapsulation. The mentioned viscosity increment would block the drug passage to the external phase. As far as used polymer amount (X_2) is concerned, the less it is used in the formulations, the better encapsulation will be. While the relationship polymer/drug decreases, the amount of available drug per particle increases.

FIGURA 2. Diagrama de superficie en función de la encapsulación de principio activo. A) Concentración de PVA y cantidad de polímero. B) Cantidad de principio activo y cantidad de polímero. C) Cantidad de principio activo y concentración de PVA.

FIGURE 2. Surface plot based on the drug content. A) Concentration of PVA and amount of polymer. B) Amount of drug and amount of polymer. C) Amount of drug and concentration of PVA.



Con respecto al tamaño de partícula, las variables independientes que influyeron significativamente son la cantidad de polímero (X_2) y la concentración de PVA (X_3). La variable independiente X_3 es la que ejerció mayor influencia sobre el tamaño de partícula (Figura 3A y 3C). Al aumentar la concentración de PVA las gotas que forman la fase interna de la emulsión se hacen más pequeñas y se obtienen partículas de menor tamaño (formulaciones F3, F4, F7 y F8). Una mayor

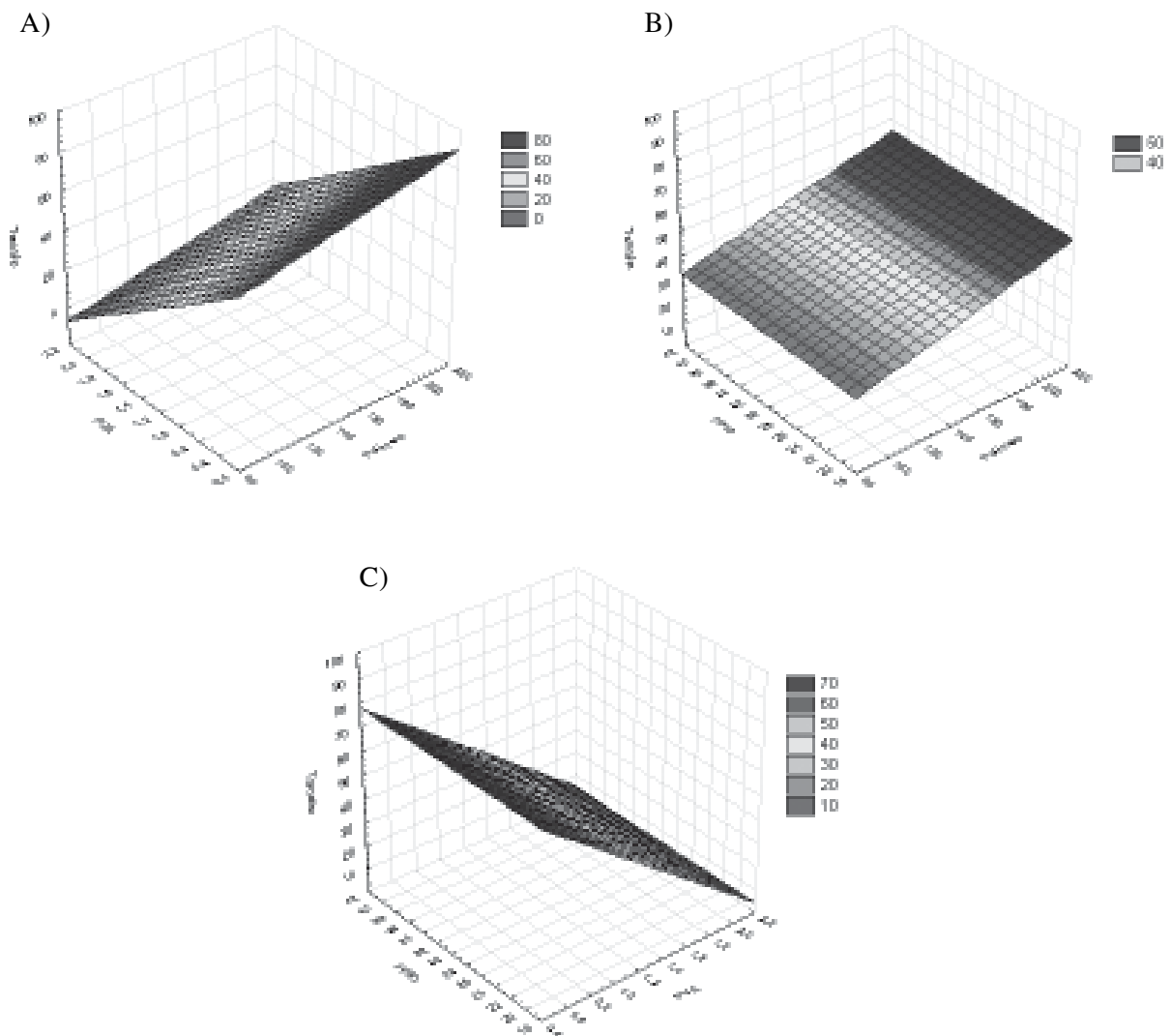
With regard to the particle size, the independent variables which have significantly influenced were the polymer amount (X_2) and the PVA concentration (X_3). Independent variable X_3 was the most effective one over the particle size (Figure 3A and 3C). When the PVA concentration is increased, the drops which constitute the internal emulsion phase get smaller and more little particles are obtained (formulations F3, F4, F7 and F8). The higher PVA concentration favours the higher stability of

concentración de PVA favorece la estabilización de las partículas de menor tamaño, lo cual disminuye la tendencia a coalescer y formar partículas de mayor tamaño. En trabajos anteriores se obtuvieron resultados similares⁸. La variable X_2 tuvo un menor efecto sobre el tamaño de partícula (*Figura 3A y 3B*). Una mayor cantidad de polímero conlleva a un aumento en la viscosidad de la fase interna de la emulsión que impide disminuir el tamaño de las gotas, con lo cual se obtienen partículas de mayor tamaño (formulaciones F1, F2, F5 y F6).

the smallest particle is obtained. This latter decreases the coalescence tendency and the formation of bigger particles. Similar results were obtained by previous workers⁸. The variable X_2 had a less effect on the particle size (*Figure 3A y 3B*). A higher polymer amount generates an increment in the viscosity of the internal phase emulsion, which impedes to diminish the drops size, granting in this way obtaining of bigger particles (formulations F1, F2, F5 and F6).

FIGURA 3. Diagrama de superficie en función del tamaño de partícula. A) Concentración de PVA y cantidad de polímero. B) Cantidad de principio activo y cantidad de polímero. C) Cantidad de principio activo y concentración de PVA.

FIGURE 3. Surface plot based on the particle size. A) Concentration of PVA and amount of polymer. B) Amount of drug and amount of polymer. C) Amount of drug and concentration of PVA.



Evaluación in vitro

Los perfiles de liberación de todas las formulaciones fueron caracterizados por un efecto inicial de liberación inmediata durante las primeras 24 horas, excepto en las formulaciones F5 y F6. Este efecto inicial de liberación inmediata, conocido como efecto *burst*, se debe a la liberación de PRG desde la superficie de la microesfera. Después de este efecto inicial se observa una liberación del principio activo en forma sostenida para todas las formulaciones, excepto para las formulaciones F4, F7 y F8.

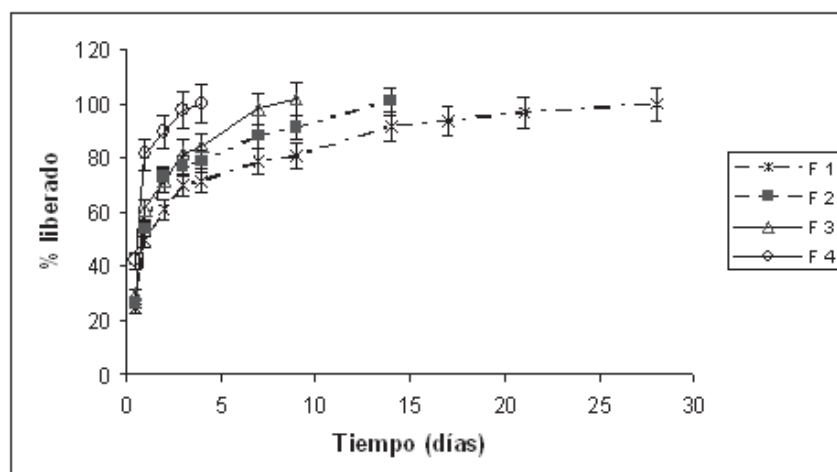
Las formulaciones preparadas con 100 mg de polímero (F1, F2, F3, F4) ven afectada su liberación según el porcentaje de encapsulación (Figura 4). Las formulaciones F1 y F2, que tienen un tamaño de partícula similar, liberan el principio activo con diferente velocidad. La formulación F2 libera más rápido que F1, esto se debe al mayor porcentaje de encapsulación de PRG. Lo mismo ocurre con F3 y F4, que poseen tamaño similar pero liberan con diferente velocidad. La formulación F3, que posee menor porcentaje de encapsulación, libera más lento que F4. En estas formulaciones, una mayor cantidad de principio activo produce un aumento en el gradiente de concentración en el medio de disolución. Este aumento en el gradiente de concentración conlleva a un aumento en la velocidad de liberación. En trabajos anteriores se obtuvieron resultados similares⁵.

In vitro evaluation

The release profiles for all the formulations have been characterized by an initial effect of immediate release for the first 24 hours, except for formulations F5 and F6. The initial effect of immediate release previously mentioned, is known as burst effect, owing to the PRG release from the microsphere surface. After this initial effect, it can be observed the release of the drug content in a sustained way for all the formulations, except for formulations F4, F7 and F8.

The release of formulations prepared with 100 mg of polymer (F1, F2, F3 and F4) depends on the percentage of encapsulation (Figure 4). The formulations F1 and F2, with a similar particle size, release the drug at different rates. The formulation F2 releases faster than F1 due to a higher percentage of PRG encapsulated. The same occurs with F3 and F4, both have a similar particle size but release at different rates. Formulation F3, which has less percentage of encapsulation, releases slower than F4. In these formulations, a greater amount of drug content produces an increment in the concentration gradient in the dissolution medium, which generates an increment in the release rate. Similar results were obtained by previous workers⁵.

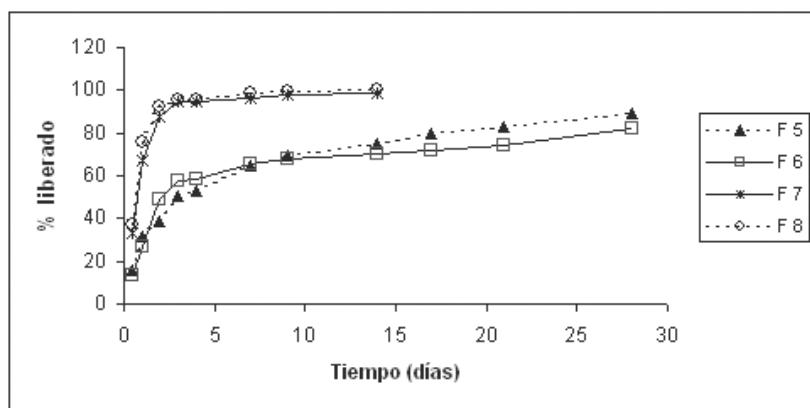
FIGURA 4. Perfiles de liberación de progesterona desde microesferas de D,L-PLA (F1, F2, F3 y F4).
FIGURE 4. Released profiles of PRG from D,L-PLA microspheres (F1, F2, F3 and F4).



En cambio, en las formulaciones preparadas con 200 mg de polímero (F5, F6, F7, F8) la liberación de PRG es influida por el tamaño de las microesferas. Las formulaciones que presentan un menor tamaño de partícula (F7 y F8) presentan una mayor velocidad de liberación de PRG debido a que presentan una mayor superficie de exposición en el medio de liberación²¹. Estas formulaciones (F7 y F8) logran alcanzar el *plateau* a los 4 días de liberación. En cambio, las formulaciones F5 y F6 presentan una menor velocidad de liberación de PRG debido al mayor tamaño de partícula (*Figura 5*). Estas formulaciones logran liberar PRG en forma sostenida durante 28 días. En estas formulaciones, la liberación no se vio afectada por el porcentaje de PRG encapsulada.

On the other hand, in formulations prepared with 200 mg of polymer (F5, F6, F7 and F8) the PRG release depends on the microsphere size. The formulations with a smaller particle size (F7 and F8) show a greater PRG release rate because of its bigger exposure surface in the release medium²¹. These formulations (F7 and F8) achieve to reach the *plateau* after 4 days of the release. However, formulations F5 and F6 show a lower PRG release rate, due to their bigger particle size (*Figure 5*). These formulations are able to release PRG in a sustained way for 28 days, and the release was not affected by the percentage of PRG encapsulated.

FIGURA 5. Perfiles de liberación de progesterona desde microesferas de D,L-PLA (F5, F6, F7 y F8).
FIGURE 5. Released profiles of PRG from D,L-PLA microspheres (F5, F6, F7 and F8).



Estudio de las cinéticas de liberación *in vitro*

Empleando el programa computacional SigmaPlot, se estudiaron las cinéticas de liberación utilizando el modelo de Orden 0, Orden 1, Higuchi y el modelo propuesto por Baker and Lonsdale²².

De acuerdo a los coeficientes de correlación (*Tabla 4*) obtenidos en el estudio de las cinéticas de liberación *in vitro* las formulaciones F4, F7 y F8 ajustan a una cinética de orden 1. Las formas farmacéuticas que se ajustan a esta cinética liberan el principio activo en forma proporcional a la cantidad de fármaco remanente en el interior del sistema. Estas formulaciones son las de menor tamaño de partícula (*Tabla 3*), lo cual genera una mayor velocidad de liberación.

In vitro release kinetics study

Employing the computer program SigmaPlot, release kinetics have been studied using the zero order model, first order model, Higuchi model and the model suggested by Baker and Lonsdale²².

According to the correlation coefficients (*Table 4*) obtained in the study of the *in vitro* release kinetics, formulations F4, F7 and F8 adjust to a first order kinetic. The pharmaceutical forms which adjust to this kinetic release the drug content proportionally to the amount of drug residual in the inside of the system. These formulations have the smallest particle size (*Table 3*), which generates a faster release rate.

TABLA 4. Coeficientes de correlación (r^2) para los modelos de orden 0, orden 1, Higuchi y Baker & Lonsdale.

TABLE 4. Determination coefficients (r^2) values for zero order model, first order model, Higuchi model and Baker & Lonsdale model.

Formulación <i>Formulation</i>	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Orden 0 (r^2) <i>Zero order (r^2)</i> $Q_t = k_0 \times t$	0,6966	0,6606	0,7485	0,6884	0,7938	0,6127	0,3912	0,3579
Orden 1 (r^2)Ln <i>First order (r^2)Ln</i> $(Q_0 - Q_t) = k_1 \times t$	0,971	0,9017	0,9665	0,9577	0,9615	0,8014	0,8059	0,8341
Higuchi (r^2) <i>Higuchi (r^2)</i> $Q_t = k_H \times t^{0.5}$	0,8449	0,8095	0,8697	0,7881	0,9259	0,7738	0,5663	0,5233
Baker & Lonsdale <i>Baker & Lonsdale</i> $(r^2)3/2[1-(1-F)^{2/3}]$ - $F = k_{bl} \times t$	0,9802	0,9613	0,9859	0,954	0,9778	0,8622	0,6405	0,6928

Las formulaciones F1, F2, F3, F5 y F6 se ajustan al modelo propuesto por Baker and Lonsdale ($3/2[1-(1-F)^{2/3}]-F = k_{bl} \times t$), donde F es la fracción de principio activo liberada a tiempo t y k_{bl} es una constante de velocidad. Generalmente, esta ecuación se ajusta a sistemas matriciales esféricos²³⁻²⁵. Este modelo asume que el paso limitante para la liberación del fármaco es la erosión de la matriz²². Por esta razón, las partículas de mayor tamaño poseen una mayor estructura para erosionar, con lo cual la PRG se libera en mayor tiempo.

Evaluación del estado físico del principio activo

Los estudios de CDB del polímero, PRG y microesferas con PRG (formulación F5) fueron realizados para caracterizar el estado físico del polímero y del principio activo. Dependiendo de la solubilidad del fármaco en el polímero y de la cantidad presente en la formulación, el principio activo puede existir en diferentes estados físicos. El estado físico del fármaco en la formulación puede afectar las características de liberación *in vitro* e *in vivo*²⁶. La figura 6 muestra las curvas de CDB para la PRG y para las microesferas con y sin PRG.

Formulations F1, F2, F3, F5 and F6 adjust to the model suggested by Baker and Lonsdale ($3/2[1-(1-F)^{2/3}]-F = k_{bl} \times t$), where F is the drug fraction released at time t and k_{bl} is rate constant. Generally, this equation adjusts to spherical matrix systems²³⁻²⁵. This model shows that the limiting path for the drug release is the matrix erosion²². For this reason, bigger particles have a greater structure for eroding and, consequently, PRG releases in more time.

Evaluation of physical state of drug content

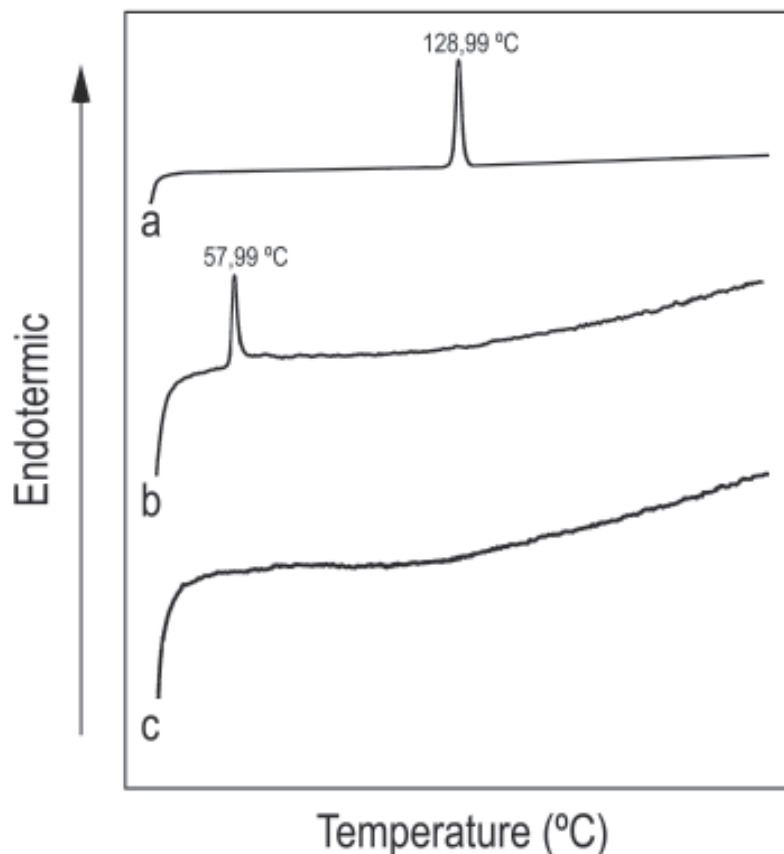
Tests of DSC of the polymer, PRG and microspheres with PRG (formulation F5) were done to characterized the physical state of the polymer and of the drug. Depending on the drug solubility on the polymer and the amount in the formulation, the drug can be found in different physical states. The drug physical state can affect the *in vitro* and *in vivo* release characteristics in the formulation²⁶. Figure 6 shows the DSC curves for the PRG and for the microspheres with and without PRG. In curve a) it can be observed an endothermic peak at 128.99 °C, corresponding to the melting point of PRG. Microspheres with PRG do

En la curva a) se observa un pico endotérmico a 128,99 °C, que corresponde al punto de fusión de la PRG. Las microesferas con PRG no presentan el pico endotérmico a 128,99 °C. Esto sugiere que la PRG se encontraría en un estado no cristalino en las microesferas. Por otra parte, las microesferas sin progesterona presentan un pico endotérmico a los 57,99 °C, que corresponde al rango de la temperatura de transición vítrea del polímero²⁷. Estos resultados sugieren que la PRG existiría en un estado amorfo en las microesferas. Los estudios realizados demuestran que existe una interacción fisicoquímica entre el principio activo y el polímero.

not show the endothermic peak at 128.99 °C. This suggests that PRG would be in a non crystalline state in the microspheres. Otherwise, microspheres without progesterone show an endothermic peak at 57.99 °C, corresponding to glass transition temperature²⁷. These results suggest that PRG would be in an amorphous state in microspheres. The studies carried out show that there exists a physicochemical interaction between the drug content and the polymer.

FIGURA 6. Perfiles de CDB de (a) progesterona; (b) microesferas vacías y (c) microesferas con progesterona (Formulación F5).

FIGURE 6. DSC profiles of (a) progesterone; (b) empty microspheres and (c) microspheres with progesterone (Formulation F5).



CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir:

1. Después de un efecto inicial inmediato de liberación, se ha obtenido una liberación de progesterona en forma sostenida desde microesferas de D,L-PLA preparadas por medio de una emulsión O/A empleando una técnica de evaporación de solvente.
2. Los resultados del análisis de varianza indican que las tres variables independientes (cantidad de principio activo, cantidad de polímero y concentración de PVA) influyeron significativamente sobre la encapsulación de PRG. En el caso del tamaño de partícula, las variables que ejercieron una influencia significativa fueron la concentración de PVA y la cantidad de polímero.
3. Los estudios de liberación *in vitro* han mostrado que de acuerdo al tamaño de partícula se pueden obtener formulaciones que logran liberar el principio activo en pocos días (F4, F7 y F8) u obtener una liberación sostenida durante 28 días (F5 y F6).
4. Los estudios de CDB demuestran que la PRG existiría en un estado amorfo en las microesferas.

Los sistemas microparticulados biodegradables desarrollados serían una interesante alternativa frente a los implantes, ya que debido a su pequeño tamaño podrían ser inyectados con una jeringa convencional, sin necesidad de una intervención quirúrgica para su aplicación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero para este trabajo provisto por UBACyT (Proyecto B027).

CONCLUSIONS

From the obtained results, the following conclusions can be drawn:

1. After an initial effect of immediate release, it has been obtained a progesterone release in a sustained way from D,L-PLA microspheres, prepared through a O/W emulsion employing a solvent evaporation method.
2. The results of analysis of variance indicate that the three independent variables (amount of drug content, amount of polymer and PVA concentration) have influenced significantly on the drug content. With regard to the particle size, the independent variables which have significantly influenced were the PVA concentration and the polymer amount.
3. In vitro release studies have shown that according to the particle size, it can be obtained formulations that achieve to release the drug in a few days (F4, F7 and F8) or a sustained release for 28 days (F5 and F6).
4. DSC studies show that PRG would be in an amorphous state in microspheres.

Biodegradable microparticulate systems developed would be an interesting alternative against implants; seeing that, owing to its small size, they could be injected by a conventional syringe with no need of a surgical operation for its application.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support for this work provided by UBACyT (Grant B027).

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Phemister DA, Laurent S, Harrison FNH. Use of norplant contraceptive implants in the immediate postpartum period: Safety and tolerance. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1995; 172 (1): 175-179.
2. Elchalal U, Abramov Y. Uterine biology and the intrauterine device. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995; 17: 151-164.

3. Singh M, O'Hagan D. The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for oral administration. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; 34: 285-304.
4. Rosilio V, Benoit JP, Deyme M, Thies C, Madelmont G. A physicochemical study of the morphology of progesterone-loaded microspheres fabricated from poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Journal of Biomedical Materials Research* 1991; 25(5): 667-682.
5. Izumikawa S, Yoshioka S, Aso Y, Takeda Y. Preparation of poly(L-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate. *J Control Release* 1991; 15(2): 133-140.
6. Aso Y, Yoshioka S, Li Wan Po A, Terao T. Effect of temperature on mechanisms of drug release and matrix degradation of poly(D,L-lactide) microspheres. *J Control Release* 1994; 31: 33-39.
7. Buntner B, Nowak M, Kasperczyk J, Ryba M, Grieb P, Walski M, Dobrzyński P, Bero M. The application of microspheres from the copolymers of lactide and ϵ -caprolactone to the controlled release of steroids. *J Control Release* 1998; 56(1-3): 159-167.
8. Yang Q, Owusu-Ababio G. Biodegradable Progesterone Microsphere Delivery System for Osteoporosis Therapy. *Drug Dev Ind Pharm* 2000; 26(1): 61-70.
9. Ikwueme S, Taylor KMG, Craig DQM, Saklatvala R. The preparation and evaluation of progesterone-loaded poly(D,L-lactide) microspheres. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52(Supplement): 17.
10. Sah H. Ethyl formate - alternative dispersed solvent useful in preparing PLGA microspheres. *Int J Pharm* 2000; 195: 103-113.
11. Han MJ, Nam ST, Lee JH. Effect of coagulating conditions on the morphology of membrane and drug being impregnated. *Polymer* 2001; 25(2): 151-159.
12. Rathbone MJ, Bunt CR, Ogle CR, Burggraaf S, Macmillan KL, Pickering K. Development of an injection molded poly(ϵ -caprolactone) intravaginal insert for the delivery of progesterone to cattle. *J Control Release* 2002; 85: 61-71.
13. Danckwerts MP, van der Watt JG. The effect of processing variables on the compression properties of controlled release core-in-cup compressed tablets from a new adjustable punch. *Int J Pharm* 1995; 123(1): 85-94.
14. Ngo TH, Vertommen J, Kinget R. Formulation of artemisinin tablets. *Int J Pharm* 1997; 146(2): 271-274.
15. Ceschel GC, Maffei P, Badiello R. Optimization of a Tablet Containing Chlorthalidone. *Drug Dev Ind Pharm* 1999; 25(11): 1167-1176.
16. Jones DS, Pearce KJ. An investigation of the effects of some process variables on the microencapsulation of propranolol hydrochloride by the solvent evaporation method. *Int J Pharm* 1995; 118: 199-205.
17. Gohel MC, Amin AF. Formulation optimization of controlled release diclofenac sodium microspheres using factorial design. *J Cont Release* 1998; 51: 115-122.
18. Elkheshen SA, Badawi SS, Badawi AA. Optimization of a Reconstitutable Suspension of Rifampicin Using 2^4 Factorial Design. *Drug Dev Ind Pharm* 1996; 22 (7): 623-630.
19. Vila Jato JL. *Tecnología Farmacéutica – Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*, Editorial Síntesis, Madrid; 1997, pp. 75-142.
20. Reynolds JEF. *Martindale-The Extra Pharmacopoeia Sex Hormones*. 31^o edition, The Royal Pharmaceutical Society, Londres; 1996, pp. 1505.
21. Sáez V, Hernández E, Sanz Angulo L, Katime I. Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 2004; 5 (2): 87-101.
22. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 2001; 13: 123-133.
23. Jun HW, Lai JW. Preparation and in vitro dissolution tests of egg albumin microcapsules of nitrofurantoin. *Int J Pharm* 1983; 16 (1): 65-77.
24. Shukla AJ, Price JC. Effect of Drug (Core) Particle Size on the Dissolution of Theophylline from Microspheres Made from Low Molecular Weight Cellulose Acetate Propionate. *Pharm Res* 1989; 6 (5): 418-421.
25. Shukla AJ, Price JC. Effect of Drug Loading and Molecular Weight of Cellulose Acetate Propionate on the Release Characteristics of Theophylline Microspheres. *Pharm Res* 1991; 8 (11): 1396-1400.
26. Dash AK. Determination of the physical state of drug in microcapsule and microsphere formulations. *J Microencapsulation* 1997; 14 (1): 101-112.
27. Kibbe AH. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 3rd edition. American Pharmaceutical Association, Washington; 2000, pp. 13-17.