

Microesferas de alginato para uso dermatofarmacéutico

Alginate microspheres for dermatopharmaceutical use

RODRÍGUEZ-LLIMÓS, AC*, BREGNI, C* Y DE LOS SANTOS-CARVALLIDO, C**

*Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
Junín 956 (1113) Buenos Aires, Argentina

**Laboratorio Dérmico Farmacéutico, Montevideo, Uruguay
E-mail: llimos@ciudad.com.ar

RESUMEN

Se desarrollaron métodos simples y reproducibles para la microencapsulación de ácido *all-trans-retinoico* (AR) y ácido salicílico (AS) en forma disuelta, con el objeto de mejorar sus aplicaciones terapéuticas y establecer criterios comparativos de las distintas metodologías empleadas. Se caracterizaron los sistemas microparticulados mediante microfotografía y distribución del tamaño de las partículas obtenidas. El desarrollo galénico de microesferas de alginato sódico, tiene como objetivo modular la liberación del AR, ya que es de interés dermatofarmacéutico optimizar la eficacia terapéutica y minimizar las reacciones secundarias, y proteger a la piel de la acción irritante del AR y del AS, preservando al AR, de la acción deletérea de agentes externos tales como el aire, la luz y la humedad.

PALABRAS CLAVE: Ácido *all-trans-retinoico*. Ácido salicílico. Alginato de sodio. Dermatofarmacia. Microesferas. Tretinoína. Vitamina A ácida.

ABSTRACT

Simple and reproducible methods were developed to microencapsulate all-trans-retinoic acid (RA) and salicylic acid (SA) in solution. The objectives of the present study were to improve their therapeutic applications and to establish comparative criteria concerning the different methodologies that have been used. The objective of RA and SA microencapsulation on the one hand, is to modulate AR release in an attempt to protect skin from AR and AS irritation and, on the other, is to protect RA from environmental hazards such as air, light and moisture.

KEY WORDS: All-trans-retinoic acid; Tretinoin; Vitamin A acid. Dermatopharmacy; Microspheres. Salicylic acid. Sodium alginate.

INTRODUCCIÓN

El alginato es un biopolímero natural que encuentra cada vez mayores aplicaciones en la industria farmacéutica y en la biotecnología. Durante muchos años, ha sido utilizado en la industria alimenticia como agente espesante, gelificante y estabilizante coloidal. También ha encontrado aplicaciones en el entrapamiento y liberación de drogas debido a sus propiedades, tales como: (a) un ambiente acuoso relativamente inerte dentro de la matriz; (b) un proceso de encapsulación que ocurre a temperatura ambien-

INTRODUCTION

Alginate is a natural biopolymer that is ever increasingly being used in industrial pharmaceutical and biotechnological applications. For many years, it has been used in the foodstuffs industry as a thickening agent, gel and colloidal stabiliser. Applications have also been found in the retention and release of drugs due to such properties as: (a) a relatively inert aqueous environment within the matrix; (b) an encapsulation process that may be carried out at ambient temperature that does not require the use of toxic

te y no requiere solventes orgánicos tóxicos; (c) un alto grado de porosidad que permite una alta velocidad de difusión para macromoléculas; (d) la posibilidad de controlar dicha difusión con simples procedimientos de "coating"; (e) disolución y biodegradación del sistema bajo condiciones fisiológicas normales⁵ (Gombotz y Wee 1998). En el siguiente estudio se utilizaron dos drogas de aplicación tópica a microencapsular en alginato: ácido *all-trans-retinoico* (AR) y ácido salicílico (AS). Por la necesidad de los principios activos de particionar entre la piel y el vehículo, debe tratarse que los principios activos se encuentren disueltos en el microencapsulado, para que la actividad terapéutica sea óptima.

La tretinoína^{11,2} (USP 25-NF 20, 2002; EPh, 2001, S), ácido *all-trans-retinoico*, fue conocida originalmente como ácido retinoico, o vitamina A ácida, por ser un metabolito oxidado del retinol o vitamina A. Si bien el mecanismo de acción no es totalmente conocido, es un fármaco con importantes indicaciones clínicas, tales como acné vulgar, piel involucionada y fotodañada; alteraciones de la queratinización; y ciertos cánceres cutáneos.

Las acciones inhibitoria a nivel de la proliferación del epitelio folicular, exfoliante, anticomedoniana e inhibitoria de la secreción e hiperplasia de la glándula sebácea, es la base farmacológica del uso del AR en el acné vulgar Tipo I-III. Por la acción estimulante y reguladora de la proliferación celular y reestructuradora de la arquitectura dermoepidérmica, la tretinoína es usada tópicamente en el control de los cambios dermatológicos que se presentan en la piel senil, involucionada fisiológicamente, la piel fotodañada por la radiación ultravioleta, tales como hiperpigmentación moteada, arrugas finas y rugosidad facial, y también en importantes alteraciones de la queratinización, como psoriasis, ciertos tipos de ictiosis, diferentes tipos de hiperqueratosis. Por su acción antimitótica, tiene indicación en el tratamiento de los carcinomas de células basales.

Según la concentración de uso 0,01% a 0,3% y la patología cutánea a ser tratada, la tretinoína presenta efectos secundarios, como irritación de la piel, que en la mayor parte de los casos, se va atenuando en el transcurso del tratamiento, sensibilidad a la luz solar, e interacción con otros medicamentos tópicos que puedan aumentar la irritación.^{1,3,6,8,10,12} (AHFS, 2002; Ezpeleta et al.,

organic solvents; (c) a high degree of porosity permitting the rapid diffusion of macromolecules; (d) the possibility of controlling such a diffusion with simple coating procedures; (e) dissolution and biodegradation of the system under normal physiological conditions⁵ (Gombotz y Wee 1998). In this study, alginate was used in the microencapsulation of the following pair of drugs for topical application: *All-trans-retinoic acid* (RA) and salicylic acid (SA). Due to the need for the active principles to break between the skin and the vehicle, they should be dissolved within the microcapsule, so as to achieve maximum therapeutic activity.

Tretinoin^{11,2} (USP 25-NF 20, 2002 Eph, 2001, S), *all-trans-retinoic acid*, was originally known as retinoic or Vitamin A acid, due to the fact that it is an oxide metabolite of retinol or vitamin A. Although its active mechanism is not totally known, it is a drug of significant clinical indications, such as common acne, involuted and photodamaged skin; Keratin alterations and certain cancers.

The inhibitory action in the proliferation of follicular epithelium, exfoliant, anticomedogenic and inhibitor of secretion and hyperplasia of the sebaceous glands is the basic pharmacological use of AR in common acne, types I-III. Because of its stimulatory and regulatory action of cell proliferation and restructuring of the dermoepidermic architecture, tretinoin is used topically in the control of dermatological changes that are present in senile, physiologically involuted skin, photodamaged skin through ultra-violet radiation, such as speckled hyperpigmentation, fine wrinkles and pitted facial skin and additionally, important keratin alterations such as psoriasis, certain types of ichthyosis, different types of hyperkeratosis. Due to its antimitotic action, it is indicated in the treatment of basal cell carcinomas.

Depending on the concentration used, from 0.01% to 0.3% and the cutaneous pathology to be treated, tretinoin presents secondary effects, such as skin irritation that in most cases, eases throughout the course of the treatment, as well as sensibility to sun-light and interaction with other topical medicines that may increase irritation.^{1,3,6,8,10,12} (AHFS, 2002; Ezpeleta et al., 1995; Kang, Voorhees, 1999; Griffiths, Wilkinson, 1998; Marcus, Coulston, 2001; Skov et al., 1997; USP DI, 2000).

1995; Kang, Voorhees, 1999; Griffiths, Wilkinson, 1998; Marcus, Coulston, 2001; Skov et al., 1997; USP DI, 2000).

La microencapsulación del AR tiene por objeto modular la liberación del principio activo, atenuar la acción irritante y, por otro lado, protegerlo de agentes externos como el aire, la luz y la humedad. Dependiendo de la concentración de uso, el AS es utilizado en una amplia variedad de enfermedades de la piel asociadas con hiperqueratosis, tales como el acné, la psoriasis, dermatitis eczematosa crónica, verrugas, queratosis actínica, queratosis pilaris e ictiosis. El AS produce descamación disminuyendo la cohesión intercorneocítica y/o aumentando la epidermopoesis. A altas concentraciones, el AS es muy irritante para la piel y las mucosas, destruyendo las células epiteliales⁴ (Gilman et al. 1986).

El objetivo del presente trabajo es desarrollar una técnica simple y reproducible para la microencapsulación de principios activos en su forma disuelta, mejorando sus aplicaciones terapéuticas y estableciendo criterios comparativos en las distintas metodologías empleadas.

MATERIALES

Alginato de sodio baja viscosidad (Sigma Chemical); polioxietileno sorbitán monolaurato (Tween 20, Merck); polioxietileno sorbitán monooleato (Tween 80, Merck); vaselina líquida (Parafarm); ácido *all-trans*-retinoico 98,78 % (Parafarm); ácido salicílico 100,38% (Parafarm); miristato de isopropilo (Parafarm); cloruro de calcio (Parafarm); éter de petróleo; etanol; citrato de sodio. Todas las drogas y reactivos se utilizaron como se recibieron.

MÉTODOS

Preparación de las microesferas

Se empleó la técnica de gelificación iónica, siguiendo tres técnicas, según se procediera: con paso intermedio de emulsión W/O; sin paso intermedio de emulsión W/O; y con paso intermedio de emulsión O/W.

En el primer caso –con paso intermedio de emulsión W/O– se preparó una emulsión primaria cuya fase acuosa está constituida por 50 ml

The microencapsulation of AR is aimed at modulating the release of the active principle, easing irritation and protecting it from external agents such as air, light and humidity. Depending on the concentration of use, AS is used for a wide range of skin diseases associated with hyperkeratosis, such as acne, psoriasis, chronic eczema, warts, actinic keratosis, keratosis pilaris and ichthyosis. AS causes peeling, decreasing intercorneocytic cohesion and/or increasing epidermopoesis. At high concentrations, AS is highly irritating to skin and mucous membranes, destroying epithelial cells⁴ (Gilman et al. 1986).

The objective of the present work is to develop principle actives in dissolved form, improving its therapeutic applications and establishing comparative criteria for the different methodologies used.

MATERIALS

Low viscosity sodium alginate (sigma Chemical); polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20, Merck); polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80, Merck); liquid vaseline (parafarm); *all-trans*-retinoic acid 98.78% (Parafarm); salicylic acid 100.38% (Parafarm); isopropyl miristate (Parafarm); Calcium chloride (parafarm); petroleum ether, ethanol; sodium citrate. All the drugs and reactives were used in the condition in which they were received.

METHODS

Preparation of the microspheres

The ionic gelling technique was employed, following three techniques, using: an intermediate stage with emulsification W/O; an intermediate stage without emulsification W/O; and an intermediate stage with emulsification O/W.

In the first case –an intermediate stage with emulsification W/O– a primary emulsion was prepared, whose aqueous phase was constituted by 50 ml of sodium alginate solution 5% P/V. A determined quantity of AS and AR were suspended separately in the sodium alginate solution. In this case, it was not possible to dissolve AR but AS could be dissolved in an aqueous solution of sodium citrate. The minimum ratio of

de una solución de alginato sódico 5 % P/V. Una cantidad conocida de AS y de AR, por separado, fue suspendida en la solución de alginato sódico. En este caso, no fue posible disolver el AR pero sí el AS en una solución acuosa de citrato de sodio. La relación mínima de citrato sódico:ácido salicílico fue 2,5:1, no modificando la consistencia del alginato que se incorporó posteriormente. A la fase oleosa, constituida por 70 ml de vaselina líquida, se le adicionaron 2 ml de Tween 20 bajo agitación para lograr una correcta homogeneización. Se incorporó luego la fase acuosa sobre la fase oleosa y se agitó durante 30 minutos a 470 rpm. El signo de la emulsión obtenida se determinó por el método de la gota⁹ (Roehl 1972) y resultó W/O. Se dispersó la emulsión desde un atomizador (Spraying Systems Co) sobre 100 ml de una solución de cloruro de calcio (7 % P/V) trabajando a una presión de 2 bar a temperatura ambiente. Las microesferas formadas se filtraron al vacío y posteriormente se hicieron lavados con éter de petróleo para eliminar la vaselina residual. Por último, se lavó el producto obtenido con etanol para eliminar el éter residual. Las micropartículas se secaron en estufa a 37 °C hasta peso constante y se tamizaron para separar las mismas según su tamaño de partícula.

Un método alternativo –sin paso intermedio de emulsión W/O– empleado para la obtención de las microesferas, fue atomizar directamente la solución de alginato de sodio con los correspondientes principios activos, lo que evita el paso intermedio de formación de la emulsión y el inconveniente de utilizar éter de petróleo para retirar la vaselina líquida. Las microesferas formadas por este método se lavaron con agua destilada. Alternativamente, se prepararon otros lotes en los que a los lavados con agua destilada le sucedieron lavados con etanol.

Otra técnica empleada –con paso intermedio de emulsión O/W– consistió en la gelificación iónica con una etapa intermedia de formación de una emulsión primaria O/W, con el objeto de que el AR se encuentre disuelto. Se disolvió el principio activo, con ayuda de sonicación, en 20 ml de miristato de isopropilo y 5 ml de Tween 80. Se agregó, bajo agitación, 75 ml de una solución de alginato de sodio (3 % P/V). El sistema se agitó durante 30 minutos a 1060 rpm. El signo de la emulsión se determinó por el método de la gota y resultó O/W. La formación de este tipo de sistemas, tendría por objeto la obtención

sodium citrate:salicylic acid was 2.5:1, without modifying the consistency of the alginate that was subsequently added. In the oil phase, made up of 70 ml of liquid Vaseline, 2 ml of shaken Tween 20 was added, in order to reach the correct degree of homogenisation. Subsequently, the aqueous phase was added to the oil phase and was stirred for 30 minutes at 470 rpm. The sign of the emulsion obtained was determined by the droplet method⁹ (Roehl 1972) and was found to be W/O. The emulsion was dispersed, using a spray (Spraying Systems Co), over 100 ml of calcium chloride solution (7% P/V) carried out at 2 bar pressure, at ambient temperature. The microspheres formed, were filtered in a vacuum and subsequently washed with petroleum ether, in order to eliminate residual Vaseline. Finally, the product obtained was washed with ethanol, in order to eliminate residual ether. The micro-particles were oven dried at 37°C until constant weight and were sieved, in order to separate them in accordance with particle size.

The alternative method used to obtain the microspheres, –an intermediate stage without emulsification W/O–, was to spray the sodium alginate solution directly with the corresponding active principles, thus avoiding the intermediate step of forming the emulsion and the consequent inconvenience of having to use petroleum ether to withdraw the liquid Vaseline. The microspheres formed through this method were washed with distilled water. Alternatively, other batches were prepared, in which those washed with distilled water were then washed with ethanol.

Another technique employed – an intermediate stage with emulsification O/W– consisted of ionic gelling with the formation of a primary emulsion O/W, as an intermediate stage, carried out with the objective of dissolving AR. With the aid of sonication, the active principle was dissolved, in 20ml of isopropyl miristate and 5ml of Tween 80, to which a solution of 75ml of sodium alginate solution (3% P/V) was added in conditions of stirring. The mixture was stirred for 30 minutes at 1060 rpm. The sign of the emulsion was determined using the droplet method and was determined as being O/W. The formation of these types of systems, have the objective of obtaining depository structures, where the interior of the microsphere would be formed by the oil phase, with the active principle dissolved.

de estructuras reservorio, donde el interior de la microesfera estaría formado por la fase oleosa, con el principio activo disuelto.

Contenido de ácido salicílico

Se pesó una cantidad conocida de microesferas con AS y se colocaron en un matraz aforado conteniendo una solución de buffer fosfato pH 7,4 que ocupa la mitad de la capacidad del envase, y se sometieron a sonicación. Luego se llevó a volumen con etanol para favorecer la solubilidad del principio activo. Se cuantificó por espectrofotometría UV (Cary 1E, Varian) a 297 nm.

Se calculó la cantidad de principio activo porcentual, expresada en mg de AS por cada 100 mg de microesferas.

Contenido de ácido all-trans-retinoico

Se pesó una cantidad conocida de microesferas con AR y se colocaron en una solución de buffer fosfato pH 7,4 bajo sonicación. Luego se extrajo la droga en un solvente en el cual fuera soluble para cuantificarlo por espectrofotometría UV (Cary 1E, Varian). El solvente utilizado fue cloruro de metileno y la longitud de onda de trabajo 365 nm. Se calculó la cantidad de principio activo porcentual, expresada en mg de AR por cada 100 mg de microesferas.

Morfología

Lotes de microesferas sin principios activos, desarrolladas por las distintas técnicas de elaboración anteriormente descritas, fueron observados en un microscopio óptico (Arcano, Línea XSZ-107 BNT) obteniéndose las microfotografías correspondientes (Figuras 1-4).

FIGURA 1. Microesferas elaboradas por el paso intermedio de formación de una emulsión W/O (400 X).

FIGURE 1. Microspheres produced with the intermediate stage of emulsion formation W/O (400 X).



Salicylic acid content

The known content of microspheres with AS was weighed and were placed into a volumetric flask containing a solution of phosphate buffer pH 7.4, which occupied half of the container, and was then subjected to sonication. The solution was then brought to volume with ethanol, in order to favour the solubility of the active principle. Quantification was carried out using UV spectrophotometry (Cary 1E, Varian) at 297 nm.

The quantity percentage of active principle was calculated, expressed in mg of AS per 100mg of microspheres.

All-trans-retinoic content

The known quantity of microspheres with AR was weighed and was placed into a solution of phosphate buffer pH 7.4 under sonication. The drug was subsequently extracted in a solvent, in which it was soluble, in order to carry out UV spectrophotometric quantification (Cary 1E, Varian). The solvent used was methylene chloride and the working wavelength was 365nm. The quantity percentage of active principle was calculated, expressed in mg of AS per 100mg of microspheres.

Morphology

The batches of microspheres without active principle, obtained through the previously described different techniques, were observed under an optical microscope (Arcano, Línea XSZ-107 BNT) from which the corresponding microphotographs were obtained (Figures 1-4).

FIGURA 2. Microesferas elaboradas sin paso intermedio de formación de una emulsión. Lavados con agua (400 X).

FIGURE 2. Microspheres produced without the intermediate stage of emulsion formation. Washed with water (400 X).

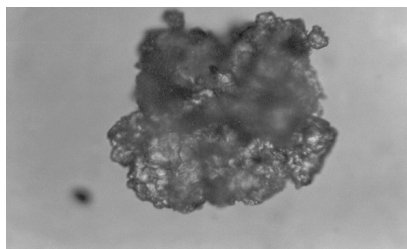


FIGURA 3. Microesferas elaboradas sin paso intermedio de formación de una emulsión. Lavados con agua y etanol (640 X).

FIGURE 3. Microspheres produced without the intermediate stage of emulsion formation. Washed with water and ethanol (640 X).

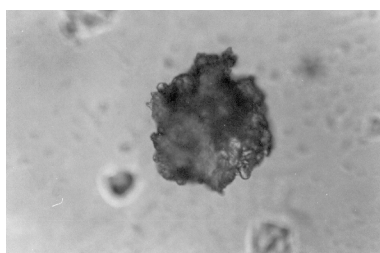
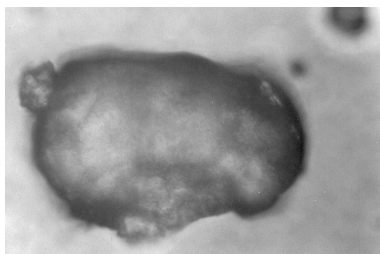


FIGURA 4. Microesferas elaboradas por el paso intermedio de formación de una emulsión O/W (400 X).

FIGURE 4. Microspheres produced with the intermediate stage of emulsion formation O/W (400 X).



Distribución del tamaño de partícula

Se tamizaron las microesferas para separarlas por tamaño de partícula (Zonytest malla N° (ASTM) 140, abertura 105 μm). Este procedimiento se repitió tres veces para diferentes lotes (Tabla 1). Posteriormente se determinó el diámetro equivalente de Martin¹³ (Vila Jato, 1997) y la distribución de tamaño de partícula por microscopía óptica, con un conteo aproximado de 300 partículas a 400 X (mínima división del retículo de 2,5 μm) (Figura 5).

Distribution of particle size

The microspheres were sieved, in order to separate them in accordance with particle size (Zonytest mesh N° (ASTM) 140, 105 μm aperture). This procedure was repeated three times for the different batches (Table 1). Subsequently, the equivalent Martin's diameter¹³ (Vila Jato, 1997) was determined together with the distribution of particles through optical microscopy, with a count of approximately 300 particles at 400 X (minimum reticle division of 2.5 μm) (Figure 5).

TABLA 1. Resultados micromeríticos de las microesferas obtenidas.

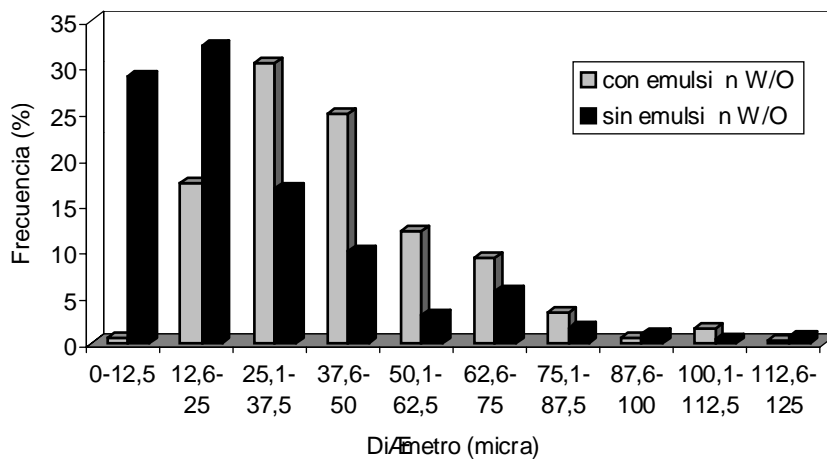
| | Microesferas totales (g) | Microesferas < 105 µm (%) | Microesferas > 105µm (%) |
|---|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Técnica con paso intermedio de emulsión W/O | 4,24 +/- 1,38 | 84,2 +/- 4,7 | 9,5 +/- 6,5 |
| Técnica sin paso intermedio de emulsión W/O (lavados con agua) | 1,41 +/- 0,42 | 4,9 +/- 2,4 | 92,5 +/- 1,6 |
| Técnica sin paso intermedio de emulsión W/O (lavados con agua y etanol) | 1,72 +/- 0,11 | 79,4 +/- 8,8 | 12,2 +/- 8,8 |
| Técnica con paso intermedio de emulsión O/W | 3,22 +/- 0,38 | 33,8 +/- 17,3 | 63,0 +/- 15,5 |

TABLE 1. Micromeritic results of the microspheres obtained.

| | Microspheres total (g) | Microspheres < 105 µm (%) | Microspheres > 105µm (%) |
|---|------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Technique using intermediate stage with emulsification W/O | 4.24 +/- 1.38 | 84.2 +/- 4.7 | 9.5 +/- 6.5 |
| Technique using intermediate stage without emulsification W/O (washed with water) | 1.41 +/- 0.42 | 4.9 +/- 2.4 | 92.5 +/- 1.6 |
| Technique using intermediate stage without emulsification W/O (washed with water and ethanol) | 1.72 +/- 0.11 | 79.4 +/- 8.8 | 12.2 +/- 8.8 |
| Technique using intermediate stage with emulsification O/W | 3.22 +/- 0.38 | 33.8 +/- 17.3 | 63.0 +/- 15.5 |

FIGURA 5. Distribución de tamaño de partícula de microesferas preparadas con y sin etapa intermedia de formación de una emulsión W/O.

FIGURE 5. Distribution of microsphere particle size prepared with and without intermediate stage of emulsion formation W/O.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La técnica de elaboración de microesferas de alginato, modificada por los autores, presenta diversas ventajas tales como no requerir temperatura ni utilizar solventes orgánicos tóxicos, excepto en la etapa de lavado. El equipamiento es sencillo, y requiere ubicar correctamente el atomizador de manera tal que el fluido no entre en contacto con las paredes del recipiente contenedor de la solución de cloruro de calcio. De este modo el alginato no gelificará en las paredes del recipiente y se obtendrán mayores rendimientos.

Los resultados obtenidos del empleo de las técnicas con y sin etapa intermedia de formación de una emulsión W/O, indican que la primera permitió obtener mayor rendimiento de microesferas totales (Tabla 1). En ambas técnicas se utilizaron 50 ml de una solución del polímero, pero se atomizaron 120 ml de emulsión contra la atomización de 50 ml de solución de alginato. Sin embargo, la técnica con formación de una emulsión es más dificultosa por la presencia de vaselina y por requerir el empleo de un solvente orgánico para el lavado.

El segundo método presentó la dificultad de que las partículas se aglomeraron luego del secado, por lo que el rendimiento de microesferas de tamaño menor a 105 μm resultó ser significativamente inferior ($P < 0.05$). Esto se solucionó en gran parte por el agregado de etanol en los lavados realizados. En cuanto a la forma de las microesferas, se observaron sistemas más esféricos para aquellas obtenidas mediante la técnica con etapa intermedia de emulsificación (Figuras 1 y 4). Se obtuvieron microesferas irregulares cuando se atomizó directamente la solución de alginato sódico (Figuras 2 y 3).

Entrampamiento de los principios activos (AR y AS)

Para la vehiculización del AS y del AR se seleccionaron métodos de emulsificación primaria W/O y O/W en función de la solubilidad de los mismos en la solución de alginato.

Los valores fueron menores para el caso de las drogas disueltas, incluso nulo para el AS (Tabla 2). Esto podría deberse a que la carga negativa de los grupos carboxílicos de la matriz de alginato repelería drogas aniónicas como las utiliza-

RESULTS AND DISCUSSION

The alginate microsphere production technique as modified by the authors, presents numerous advantages, such as that of not requiring the use of temperature or toxic organic solvents, except at the washing stage. The equipment is simple, and it is necessary to ensure that spray is positioned correctly, so that the fluid does not enter into contact with the container holding the calcium chloride solution. In such a way, the alginate will not gel on the walls of the container and a higher yield will be obtained.

The results obtained from techniques using intermediate stages with and without emulsion formation W/O, indicate that the former enabled the highest total yield of microspheres (Table 1). In both techniques 50ml of a polymer solution were used, but 120ml of emulsion were sprayed, as against the spraying of 50ml of alginate solution. However, the technique for the formation of an emulsion is more difficult to carry out, due to the presence of Vaseline, which requires the use of an organic solvent for the washing process.

The difficulty observed in the second method was the agglomeration of particles subsequent to the drying process, which resulted in a significantly lower yield of microspheres of a particle sizes smaller than 105 μm . This problem was solved to a large degree through the addition of ethanol during the washing process. With regard to the shape of the microspheres, the intermediate stage emulsification technique yielded spheroid systems (Figures 1 & 4). Irregular microspheres were observed when sodium alginate solution was sprayed directly (Figures 2 & 3).

The entrapment of active principles (AR & AS)

In order to create a vehicle in which to carry AS and AR, primary emulsification methods W/O and O/W were chosen on the basis of their solubility in alginate solution.

The values were lower in the case of dissolved drugs and even reached a zero value in the case of AS (Table 2). This could be attributed to the negative charge of the carboxylic groups in the alginate matrix, which would repel anionic drugs like those used in this work¹⁴ (You et al., 2001). The AR molecule is larger in size than

das en este trabajo¹⁴ (You et al., 2001). El AR es una molécula de mayor tamaño que la del AS, por ende, la carga negativa no sería tan influyente en la formación del sistema y el entrapamiento del AR sería mayor que para el AS. Existe además el factor limitante de la cantidad de droga inicial que es posible disolver.

that of AS, consequently, the negative charge would not represent so much of an influencing factor in the formation of the system and the entrapment of AR would be greater than it would be in the case of AS. Furthermore, the quantity of initial drug that it is possible to dissolve represents another limiting factor.

TABLA 2. Cantidad de AR y AS entrapados en las microesferas en función de la metodología utilizada.

| Principio activo al estado de: | ácido <i>all-trans-retinoico</i> (% P/P) | ácido salicílico (% P/P) |
|--------------------------------|--|--------------------------|
| Suspensión | 30,7 +/- 2,3* | 8,0 +/- 0,6* |
| Disolución | 2,4 +/- 0,4** | 0* |

* Método de emulsión W/O.

** Método de emulsión O/W.

TABLE 2. Quantity of AR & AS trapped in the microspheres in accordance with the methodology used

| Active principle in the state of: | <i>All-trans-retinoic acid</i> (% P/P) | Salicylic acid (% P/P) |
|-----------------------------------|--|------------------------|
| Suspension | 30.7 +/- 2.3* | 8.0 +/- 0.6* |
| Dissolution | 2.4 +/- 0.4** | 0* |

* Emulsification method W/O.

** Emulsification method O/W.

Si bien el AR se utiliza en un amplio rango de concentraciones 0,1% a 0,3%, la que usualmente se utiliza en las formas dermatofarmacéuticas, es de 50 mg % P/P, por lo que siguiendo el criterio de optimizar la eficacia terapéutica formulando el AR en forma disuelta en el sistema microencapsulado de la forma farmacéutica de aplicación, es posible alcanzar esta concentración de principio activo, con la incorporación de aproximadamente un 2 % P/P de microesferas conteniendo AR disuelto, dispersas en un sistema semisólido de aplicación tópica. Esto no es posible lograrlo al presente con el AS.-

Even though AR is used over a wide range of concentrations from 0.1% to 0.3%, the concentration used in dermatopharmaceutical forms is 50mg % P/P. In order to optimise therapeutic effectiveness by forming AR in dissolved form in a microencapsulated system for pharmaceutical application, it is possible to reach such a concentration of active principle with the incorporation of approximately 2% P/P of microspheres containing dissolved AR, dispersed in a semi-solid system for topical application. At present, it is not possible to achieve this with AS.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado por Convenio Específico entre UBATEC S.A. (Universidad de Buenos Aires Tecnología S.A.), República Argentina y Laboratorio Dérmico Farmacéutico, Naltisur S.A., República Oriental del Uruguay.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out through a specific agreement between UBATEC S.A. (University of Buenos Aires Technology S.A.), Republic of Argentina and the Naltisur Dermopharmaceutical Laboratory S.A., Eastern Republic of Uruguay.

BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

1. AHFS Drug Information. Tretinoin. p.3449. Editor American Society of Health-System Pharmacists, Inc. Bethesda 2002.
2. European Pharmacopoeia. 3th edition, supplement, p.1533. Council of Europe, France 2001.
3. Ezpeleta I, Irache JM, Stainmesse S, Chabenat C, Gueguen J, Popineau Y *et al.* Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-*trans*-retinoic acid. *Int. J. Pharm.* 1995; 131: 191-200.
4. Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 7º edición. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana, 1986.
5. Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; 31: 267-285.
6. Griffiths WAD, Wilkinson JD. Topical Therapy. En: Champion RH, Burton JL, Burns DA, editors. *Textbook of Dermatology*. London: Blackwell Science, 1998; p.3556.
7. Kang S, Voorhees JJ. Topical Retinoids. En: Fitzpatrick's. Ed.: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, editors. *Dermatology in General Medicine*. New York: Mc.Graw-Hill, 1999; p.2726-2733.
8. Marcus R, Coulston AM. Retinoic acid. En: Goodman & Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Hardman JG, Limbird LE, editors. New York: Mc.Graw-Hill, 2001; p.1781.
9. Roehl EL. Stability tests for emulsions. *Soap. Perfum. Cosm.* 1972; 45: 343-350.
10. Skov MJ, Quigley JW, Bucks DAW. Topical Delivery System for Tretinoin: Research and Clinical Implications. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86(10): 1138-1143.
11. The United States Pharmacopoeia. 25th edition, p.1739-1741. The United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, MD, 2002.
12. The United States Pharmacopoeia. *Drug Information for the Health Care Professional*. 20th edition, p. 3046. Micromedex, 2002.
13. Vila Jato JL. *Tecnología Farmacéutica*. Madrid: Síntesis, 1997.
14. You JO, Park SB, Park HY, Haam S, Chung CH, Kim WS. Preparation of regular sized Ca-alginate microspheres using membrane emulsification method. *J. Microencapsulation* 2001; 18(4): 521-532.