

SISTEMAS DE TRANSPORTE Y LIBERACION DE FARMACOS: ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE MICROESFERAS LIPIDICAS PORTADORAS DE CICLOSPORINA A.

P.J. Hernández, M.M. Medina, A. Cerezo y J. Sánchez.
Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Cátedra de Farmacia Galénica. Universidad de Granada. España.

INTRODUCCION

Dentro de los nuevos sistemas de transporte y liberación de fármacos destacan las microesferas lipídicas, debido sobre todo a las numerosas ventajas que presentan frente al resto. Conviene señalar, entre otras, su elevada estabilidad, la amplia experiencia clínica que existe en el uso de emulsiones grasas de administración intravenosa, así como la posibilidad de poder ser elaboradas a gran escala.

Estos sistemas de tamaño de micropartícula, caracterizados como emulsiones de fase externa acuosa (O/A), han servido para la incorporación de numerosos principios activos. Así, MIZUSHIMA y cols. han encapsulado diversos antiinflamatorios tanto de naturaleza esteroídica (dexametasona) (1982), como no esteroídica (indometacina) (1983 a), prostaglandinas bronco y vasodilatadoras (PGE₁) (1983 b) y agentes citostáticos (1986).

Nuestro objetivo ha sido la incorporación a microesferas de lípidos de un fármaco de acción inmunosupresora ampliamente utilizado en la terapéutica clínica actual, la ciclosporina A. Se trata de una molécula catalogada como de índice terapéutico bajo, manifestando además numerosas diferencias interindividuales en sus parámetros farmacocinéticos. Pero es sobre todo su elevada nefrotoxicidad (KOREN, 1989), lo que aconseja la modificación de su forma de administración, al objeto de mejorar su biodisponibilidad, seguridad y eficacia.

Tras un estudio exhaustivo sobre la incorporación de dicho principio activo a esta modalidad de microesferas, y obteniendo en todos los casos unos porcentajes de encapsulación cercanos al 90 % (HERNANDEZ y cols., 1991), se ha evaluado la estabilidad a temperatura ambiente de cuatro formulaciones diferentes de microesferas lipídicas portadoras de ciclosporina A durante un periodo de tiempo de 90 días.

MATERIAL Y METODOS

En el Cuadro 1 aparecen recogidas las cuatro formulaciones seleccionadas para el estudio de estabilidad. Se indica su composición, la concentración de sus diversos componentes en g/100 ml, así como la proporción (P/P) de aceite de soja/lecitina de soja. En todas ellas, la concentración inicial de ciclosporina A (Sandoz) es constante e igual a 0,020 g/100 ml.

Como integrantes de las diferentes formulaciones figuran: aceite refinado de soja (Campi Jove), lecitina de soja (J. Escuder), colesterol (Merck), tween 80 (Glyco Ibérica) y glicerina (Campi Jove).

Las formulaciones han sido seleccionadas en base a los resultados obtenidos tras la normalización del método de obtención de microesferas lipídicas (HERNANDEZ y cols., 1989 a) y el estudio de la encapsulación de ciclosporina A (HERNANDEZ y cols., 1991). La fórmula número 1, corresponde a la de menor tamaño de partícula. La número 2 es la que mayor porcentaje de principio activo encapsuló recién elaborada. Con la número 3 se pretende evaluar la influencia del colesterol sobre la estabilidad de las microesferas, y con la fórmula número 4, la influencia conjunta del colesterol y del tween 80.

El método de obtención seguido es el previamente normalizado (HERNANDEZ y cols., 1989 a) y basado en la técnica descrita por MIZUSHIMA y cols. (1982) para la elaboración del Intralipid[®] 10 %. En primer lugar, se solubilizan por separado los componentes de ambas fases (fase acuosa y fase oleosa), incorporando la ciclosporina junto a todos los componentes de la fase oleosa. La interposición se realiza con el empleo de un agitador mecánico (Omni mixer; Sorvall; modelo 230), a la velocidad inicial de 10000 rpm/30 seg y posteriormente 4000 rpm/15 min. La emulsión así obtenida se homogeniza haciéndola atravesar membranas filtrantes de 1,2 µm de diámetro de poro.

Con el fin de evaluar la estabilidad de las microesferas, las cuatro formulaciones se mantienen a temperatura ambiente durante 90 días. A intervalos de 10 días, se toman muestras para su separación mediante cromatografía de exclusión molecular, empleando un gel de dextrano (Sephadex G-50 fino; Pharmacia Fine Chemicals) como fase estacionaria y agua destilada com fase móvil. La monitorización del proceso separativo se efectúa en un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin Elmer; Hitachi; modelo 124)

provisto de célula de flujo continuo a 210 nm. La fracción de ciclosporina A libre es recogida y solubilizada en cantidad suficiente de etanol para su valoración espectrofotométrica. Por diferencia entre el porcentaje encapsulado el día cero y los obtenidos en días sucesivos, se puede determinar el porcentaje de ciclosporina captado perdido en función del tiempo.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras el estudio de la estabilidad de las muestras de microesferas de ciclosporina A, mantenidas a temperatura ambiente durante 90 días, figuran en los Cuadros 2-5. En ellos se indican los porcentajes de principio activo captado, experimental y teórico, así como el porcentaje perdido, a lo largo del periodo de estudio. Los valores experimentales de ciclosporina A captada corresponden a la media aritmética de cinco determinaciones, incluyéndose las desviaciones estándar de los mismos.

Las representaciones gráficas del porcentaje de ciclosporina A perdido en función del tiempo para cada una de las formulaciones estudiadas, se corresponden con las Figuras 1-4.

Las figuras 5-8 ofrecen las representaciones gráficas de los procesos cinéticos de degradación de las diferentes formulaciones ensayadas. Además, se incluye la ecuación que rige el proceso, la constante de degradación y los coeficientes de correlación lineal, experimentales y teóricos.

DISCUSION

En una primera aproximación, se puede indicar que no se han producido pérdidas elevadas de ciclosporina A encapsulada, a lo largo del periodo de estudio. Sin embargo, y aunque las diferencias observadas entre las cuatro formulaciones ensayadas no son considerables, sería importante destacar los resultados derivados de la presencia o no de tween 80 en la composición de las microesferas.

Comparando los datos experimentales proporcionados por las fórmulas número 1,2 y 4 (Cuadros 2,3 Y 5 respectivamente), se deduce un cierto efecto negativo del tween 80 sobre la estabilidad de estos sistemas. Su incorporación, a una concentración de 0,50 g/100 ml de emulsión (fórmula 1) origina pérdidas de principio activo encapsulado superiores a las

constatadas en aquellas muestras que no lo incluyen (fórmulas 2 y 4). Así, transcurridos 90 días desde la preparación, las microesferas lipídicas obtenidas de acuerdo con la fórmula número 1 liberaron el 17,28 % del agente inicialmente encapsulado. Para las fórmulas número 2 y 4, dicha liberación fue del 10,19 % y del 12,87 %, respectivamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos tras el estudio de la estabilidad de microesferas lipídicas portadoras de vitamina K₃ (HERNANDEZ y cols., 1989 b).

Por otro lado, la fórmula número 3 (Cuadro 4) caracterizada por no contener colesterol, experimenta una pérdida de ciclosporina A a los 90 días de iniciado el estudio (16,68 %), similar a la observada en las microesferas elaboradas con 0,50 g de colesterol/100 ml de emulsión e idénticas cantidades del resto de componentes que la anterior (fórmula 1, Cuadro 2).

No obstante, al prescindir conjuntamente de colesterol y tween 80 en el momento de la preparación (fórmula 4), se aprecia una ligera disminución en el porcentaje de agente perdido a los 90 días (12,87 %).

El posible efecto estabilizante determinado por el colesterol, en ausencia de tween 80, constatado para las microesferas portadoras de vitamina K₃, no aparece tan claro en este caso. En efecto, si se consideran los resultados aportados por las muestras sin tween 80, diferenciadas por la incorporación o no de colesterol (fórmulas 2 y 4, respectivamente), el porcentaje final de agente perdido varía tan sólo del 10,19 % al 12,87 %. Sin embargo, a partir del día 40, la liberación se intensifica en las microesferas lipídicas elaboradas únicamente con aceite:lecitina (1:1,8 P/P) y glicerina (fórmula 4, Cuadro 5), en comparación con aquellas que también incluyen colesterol (fórmula 2, Cuadro 3).

Las diferencias más representativas se producen entre las formulaciones que contienen tween 80 (fórmulas 1 y 3) y las que no lo incluyen en su composición (fórmulas 2 y 4). En base a los datos del estudio de la cinética de degradación de las microesferas de ciclosporina A, se ha podido comprobar como el proceso de inestabilidad de las microesferas elaboradas de acuerdo con las fórmulas 1, 2 y 4 (Figuras 5, 6 y 8), está regido por una ecuación de orden cero. En cambio, la fórmula número 3, caracterizada por incluir tween 80 en su composición, pero no colesterol, ha presentado una liberación de principio activo irregular, apreciándose a primera vista una elevada pérdida de

agente encapsulado nada más iniciarse el estudio (Figura 3). Los datos no se ajustan totalmente a una cinética de orden cero (Figura 7), ni tampoco de orden uno.

Como conclusión final, en base a los resultados discutidos, la formulación más idónea para el transporte y liberación de ciclosporina A en microesferas lipídicas es la constituida por aceite de soja:lecitina de soja en relación 1:1,8 (P/P), colesterol (0,50 g/100 ml) y glicerina (0,63 g/100 ml). Dicha fórmula es la que ha presentado un mayor porcentaje de agente activo captado ($94,09 \pm 2,87 \%$), perdiendo tan sólo el 10,19 % a los 90 días de su elaboración.

BIBLIOGRAFIA

- HERNANDEZ, P.J., MEDINA, M.M., CEREZO, A. y SANCHEZ, J. 1989 a. Microesferas lipídicas: Método de obtención y caracterización. Pharmaklinik, Vol. nº 3(4): 163-167.
- HERNANDEZ, P.J., MEDINA, M.M., CEREZO, A. y SANCHEZ, J. 1989 b. Sistemas de transporte y liberación de fármacos: Estudio de la estabilidad de microesferas lipídicas. Comunicación presentada al XXXIV Congreso Nacional de la S.E.F.H. León.
- HERNANDEZ, P.J., MEDINA, M.M., CEREZO, A. y SANCHEZ, J. 1991. Microesferas lipídicas: Estudio de la encapsulación de ciclosporina A. Comunicación presentada al IV Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Barcelona.
- KOREN, G. 1989. Nephrotoxic potential of drugs and chemicals: Pharmacological basis and clinical relevance. Medical Toxicology. Vol. nº 4: 59-72.
- MIZUSHIMA, Y., HAMANO, T. y YOKOYAMA, K. 1982. Use a lipid emulsion as a novel carrier for corticosteroids. J. Pharm. Pharmacol. Vol. nº 34: 49-50.
- MIZUSHIMA, Y., HAMANO, T. y YOKOYAMA, K. 1983 a. Anti-inflammatory effects of indomethacin ester incorporated in a lipid microsphere. J. Pharm. Pharmacol. Vol. nº 35: 398-399.
- MIZUSHIMA, Y., YANAGAWA, A. y HOSHI, K. 1983 b. Prostaglandin E_1 is more effective when incorporated in lipid microspheres, for treatment of peripheral diseases in man. J. Pharm. Pharmacol. Vol. nº 35: 666-667.
- MIZUSHIMA, Y., SHOJI, Y., KATO, T., FUKUSHIMA, M. y KUROSUMI, S. 1986. Use a lipid microspheres as a drug carrier for antitumour drugs. J. Pharm. Pharmacol. Vol. nº 38: 132-134.

CUADRO 1

**FORMULACIONES ELABORADAS PARA EL ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE
MICROESFERAS LIPIDICAS PORTADORAS DE CICLOSPORINA A**

MUESTRA (nº)	FORMULACION	PROPORCION AS:LS (P/P)	CONCENTRACION (g/100 ml)					
			AS	LS	CH	TW	GL	Cs A
1	AS-LS-CH-TW-GL-Cs A	1:1,8	0,685	1,25	0,50	0,50	0,63	0,020
2	AS-LS-CH-GL-Cs A	1:1,8	0,685	1,25	0,50	--	0,63	0,020
3	AS-LS-TW-GL-Cs A	1:1,8	0,685	1,25	--	0,50	0,63	0,020
4	AS-LS-GL-Cs A	1:1,8	0,685	1,25	--	--	0,63	0,020

AS: Aceite de soja; LS: Lecitina de soja; CH: Colesterol; TW: Tween 80;
GL: Glicerina; Cs A: Ciclosporina A.

CUADRO 2**ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE MICROESFERAS LIPIDICAS
PORTADORAS DE CICLOSPORINA A**

FORMULA NUMERO 1 (n=5)

DIA	PORCENTAJE Cs A CAPTADO EXPERIMENTAL (%)	PORCENTAJE Cs A CAPTADO TEORICO (%)	PORCENTAJE Cs A PERDIDO (%)
0	86,81 ± 3,44	100	0
10	84,37 ± 4,67	97,19	2,44
20	85,97 ± 8,36	99,03	0,84
30	82,89 ± 3,32	95,48	3,92
40	77,59 ± 2,59	89,38	9,22
50	77,27 ± 4,44	89,01	9,54
60	76,76 ± 8,70	88,42	10,05
70	75,16 ± 7,80	86,58	11,65
80	72,31 ± 9,03	83,30	14,50
90	69,53 ± 7,78	80,09	17,28

CUADRO 3**ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE MICROESFERAS LIPIDICAS
PORTADORAS DE CICLOSPORINA A**

FORMULA NUMERO 2 (n=5)

DIA	PORCENTAJE Cs A CAPTADO EXPERIMENTAL (%)	PORCENTAJE Cs A CAPTADO TEORICO (%)	PORCENTAJE Cs A PERDIDO (%)
0	94,09 ± 2,87	100	0
10	95,63 ± 3,18	100	0
20	93,23 ± 5,27	99,09	0,86
30	88,72 ± 5,19	94,29	5,37
40	90,07 ± 3,24	95,73	4,02
50	85,18 ± 3,16	90,53	8,91
60	90,07 ± 3,32	95,73	4,02
70	88,14 ± 2,65	93,68	5,95
80	86,19 ± 6,72	91,60	7,90
90	83,90 ± 4,27	89,17	10,19

CUADRO 4**ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE MICROESFERAS LIPIDICAS
PORTADORAS DE CICLOSPORINA A**

FORMULA NUMERO 3 (n=5)

DIA	PORCENTAJE Cs A CAPTADO EXPERIMENTAL (%)	PORCENTAJE Cs A CAPTADO TEORICO (%)	PORCENTAJE Cs A PERDIDO (%)
0	86,80 ± 3,82	100	0
10	74,31 ± 1,89	85,61	12,49
20	79,06 ± 11,40	91,08	7,74
30	69,04 ± 11,10	79,54	17,76
40	68,16 ± 10,08	78,53	18,64
50	72,46 ± 9,60	83,48	14,34
60	76,32 ± 8,92	87,93	10,48
70	77,63 ± 9,89	89,44	9,17
80	70,84 ± 8,68	81,61	15,96
90	70,12 ± 7,69	80,78	16,68

CUADRO 5**ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE MICROESFERAS LIPIDICAS
PORTADORAS DE CICLOSPORINA A**

FORMULA NUMERO 4 (n=5)

DIA	PORCENTAJE Cs A CAPTADO EXPERIMENTAL (%)	PORCENTAJE Cs A CAPTADO TEORICA (%)	PORCENTAJE Cs A PERDIDO (%)
0	91,81 ± 2,42	100	0
10	91,54 ± 3,58	99,71	0,27
20	91,22 ± 5,92	99,36	0,59
30	88,78 ± 3,97	96,70	3,03
40	84,04 ± 7,15	91,54	7,77
50	82,31 ± 6,07	89,65	9,50
60	79,55 ± 8,44	86,65	12,26
70	81,81 ± 9,82	89,11	10,00
80	80,04 ± 9,14	87,18	11,77
90	78,94 ± 7,80	85,98	12,87

FIGURA 1
ESTABILIDAD DE MICROESFERAS LIPIDICAS
PORTADORAS DE CICLOSPORINA A

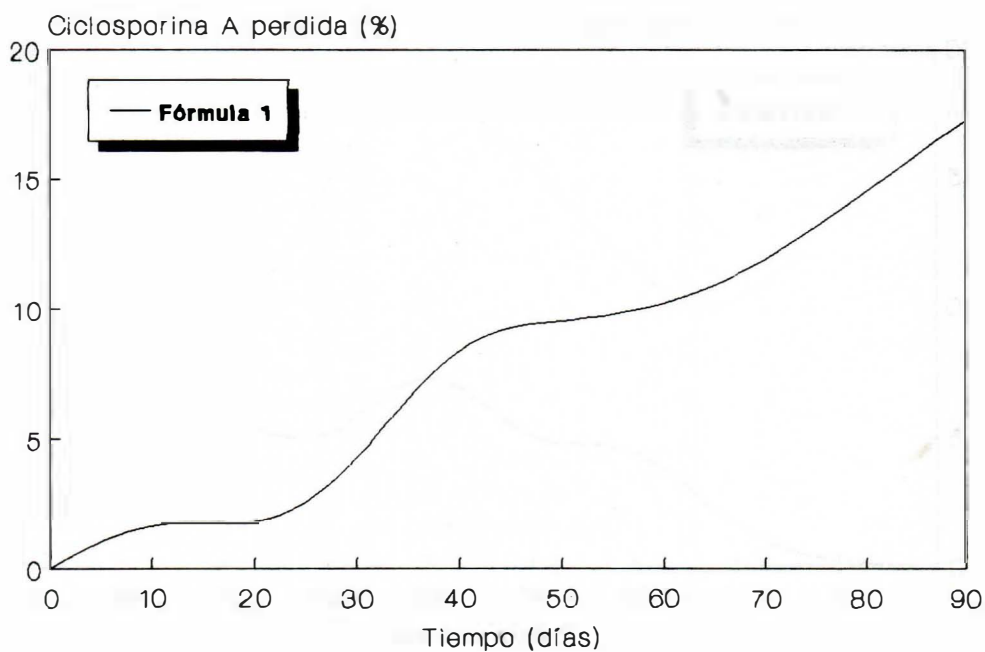


FIGURA 2
ESTABILIDAD DE MICROESFERAS LIPIDICAS
PORTADORAS DE CICLOSPORINA A

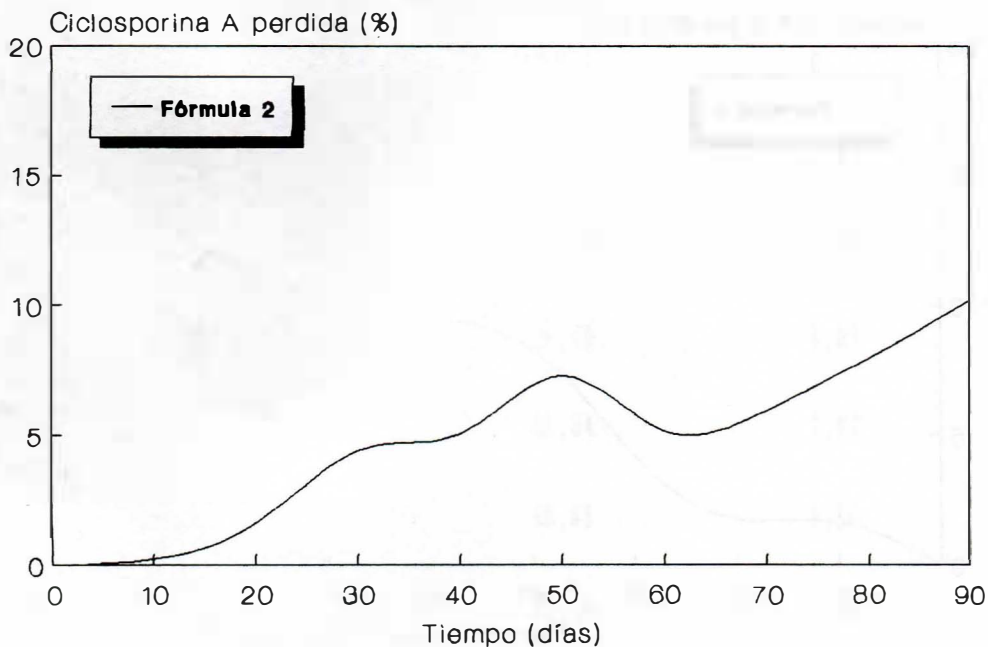


FIGURA 3
ESTABILIDAD DE MICROESFERAS LIPIDICAS
PORTADORAS DE CICLOSPORINA A

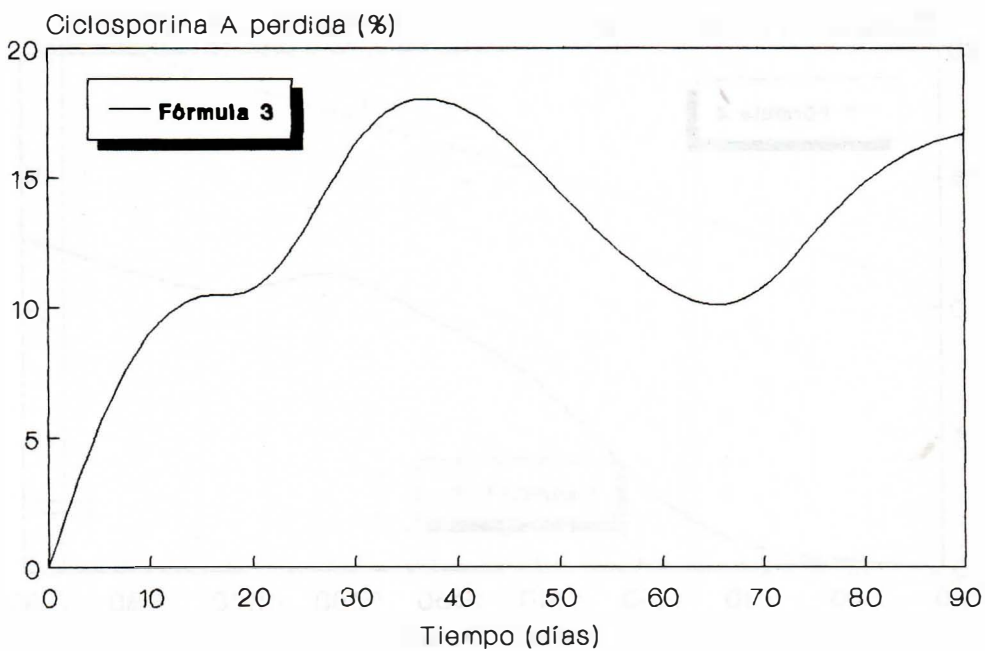


FIGURA 4
ESTABILIDAD DE MICROESFERAS LIPIDICAS
PORTADORAS DE CICLOSPORINA A

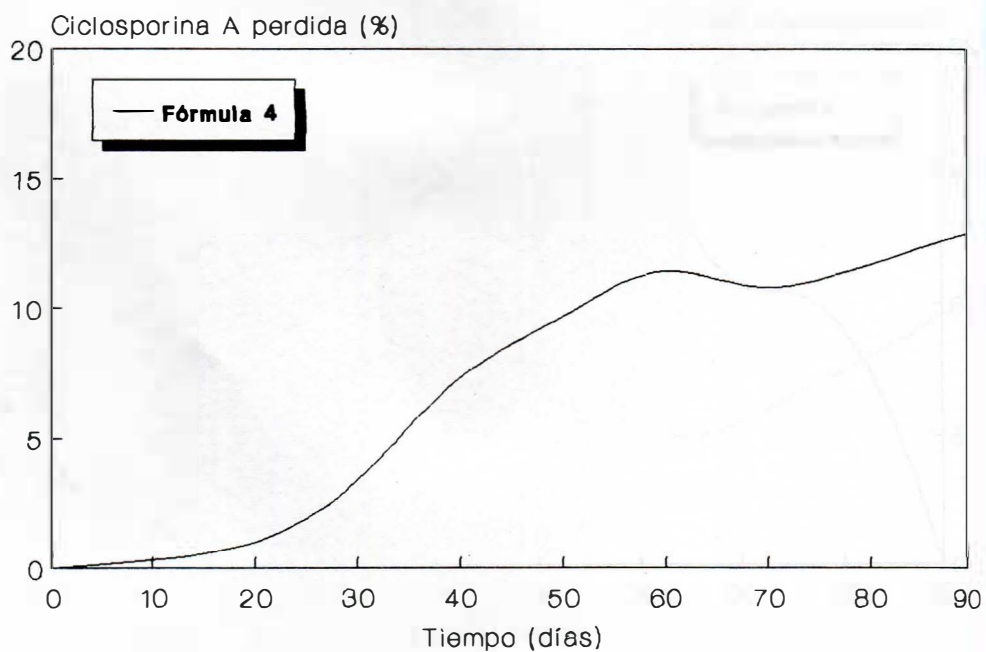
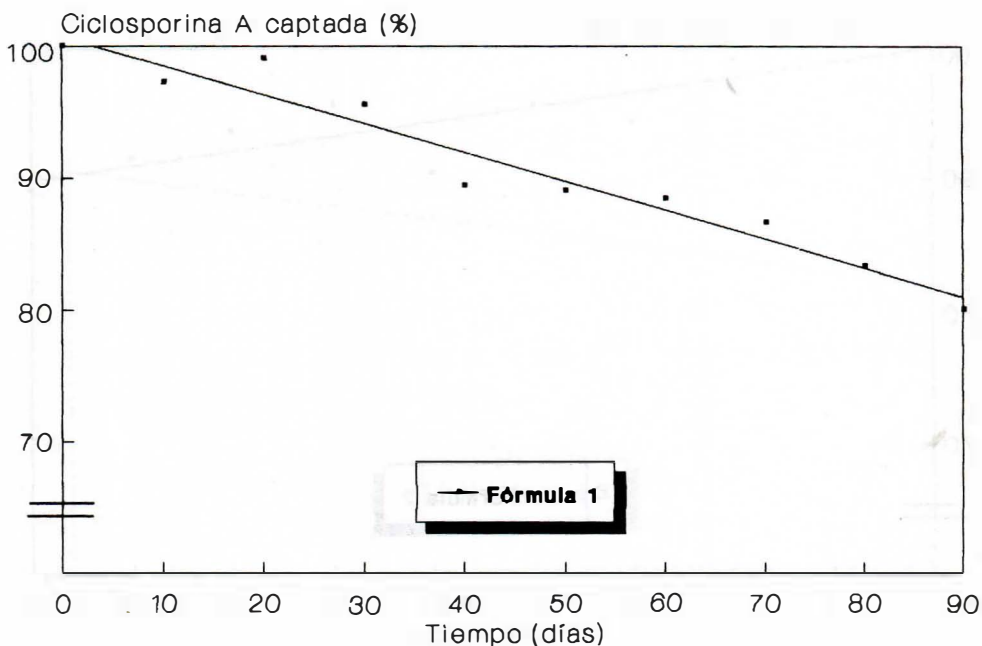
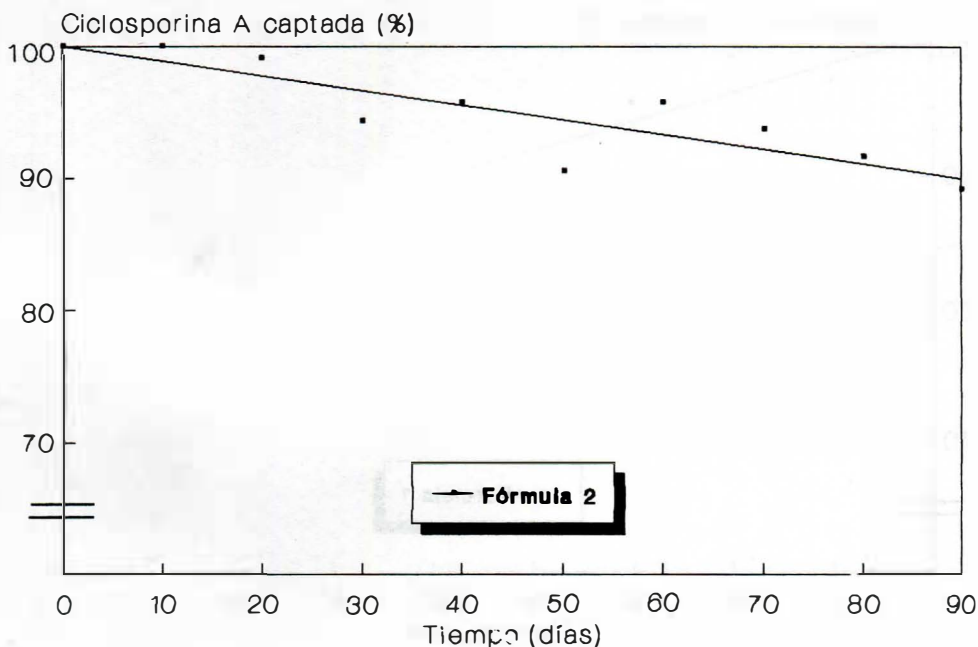


FIGURA 5
ESTUDIO CINETICO DE M. LIPIDICAS
PORTADORAS DE CICLOSPORINA A



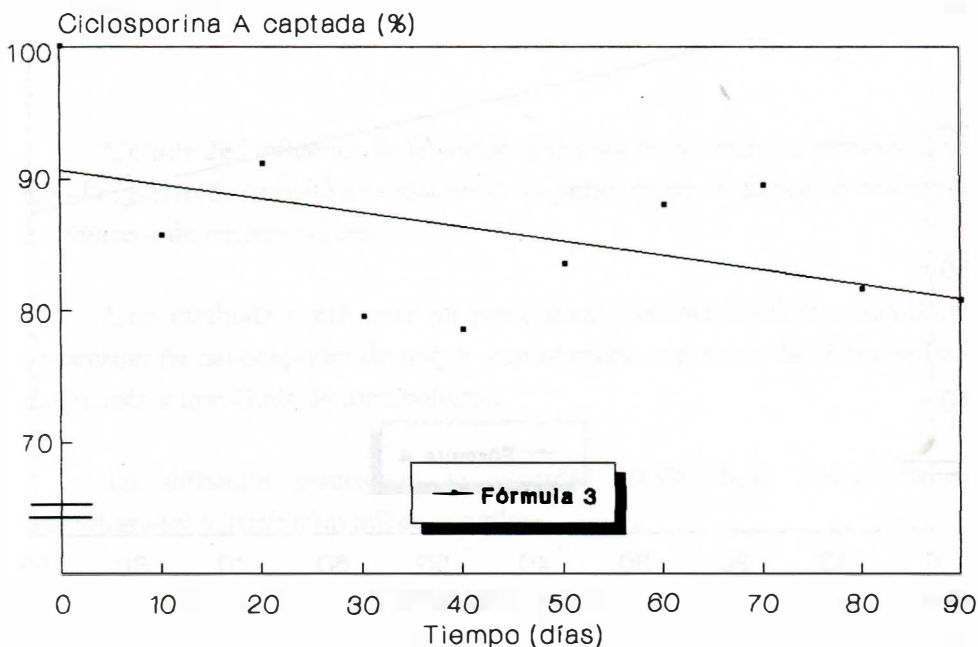
- Ecuación de la recta: $Y = 100,6722 - 0,2183.X$
- Cte. degradación: $- 0,2183$
- Coef. correlación experimental: $- 0,9737$
- Coef. correlación teórico: $0,8783 (0,05)$ y $0,9587 (0,01)$

FIGURA 6
ESTUDIO CINETICO DE M. LIPIDICAS
PORTADORAS DE CICLOSPORINA A



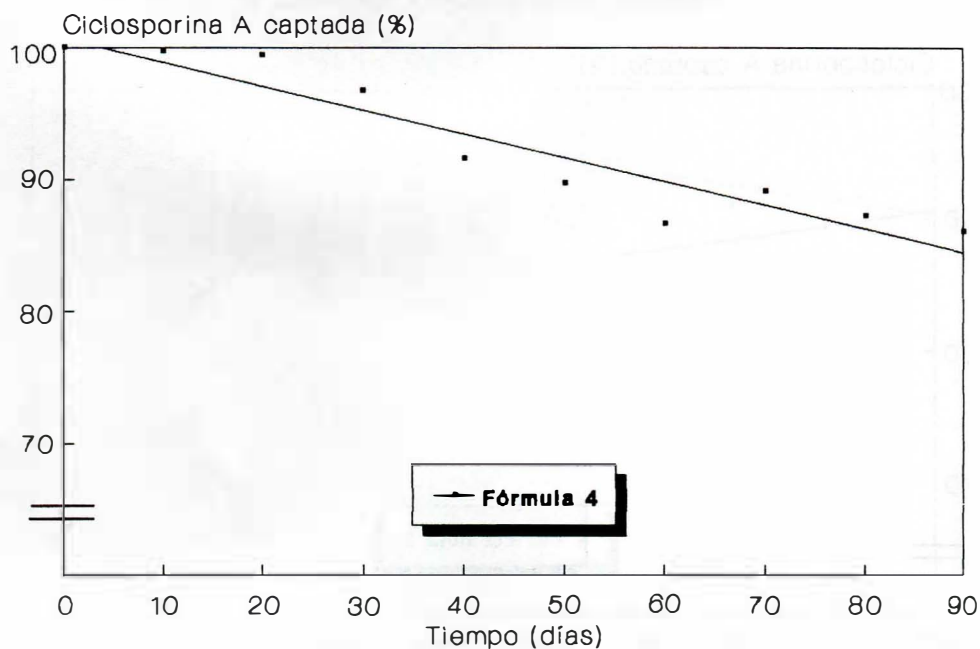
- Ecuación de la recta: $Y = 100,0056 - 0,1116.X$
- Cte. degradación: $-0,1116$
- Coef. correlación experimental: $-0,8708$
- Coef. correlación teórico: $0,8783 (0,05)$ y $0,9587 (0,01)$

FIGURA 7
ESTUDIO CINETICO DE M. LIPIDICAS
PORTADORAS DE CICLOSPORINA A



- Ecuación de la recta: $Y = 90,6834 - 0,1085 \cdot X$
- Cte. degradación: $- 0,1085$
- Coef. correlación experimental: $- 0,5007$
- Coef. correlación teórico: $0,8783 (0,05)$ y $0,9587 (0,01)$

FIGURA 8
ESTUDIO CINETICO DE M. LIPIDICAS
PORTADORAS DE CICLOSPORINA A



- Ecuación de la recta: $Y = 100,6929 - 0,1801.X$
- Cte. degradación: $- 0,1801$
- Coef. correlación experimental: $- 0,9470$
- Coef. correlación teórico: $0,8783 (0,05)$ y $0,9587 (0,01)$