

ESTUDIO *IN VITRO* DE MICROESFERAS BIODEGRADABLES CONTENIENDO ANFOTERICINA B COMO ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DE OSTEOMIELITIS CAUSADA POR *CANDIDA ALBICANS*

Isabel Soriano; M^a Josefa Gil ; Carmen Evora

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. Santa Cruz de Tenerife.

Introducción

La anfotericina B es un agente antifúngico con acción bacteriostática, del grupo de los macrólidos poliénicos. Desde los años 60 es considerada el antifúngico más eficaz tanto *in vivo* como *in vitro* (1,2). El tratamiento y prevención de infecciones óseas requieren niveles de antibiótico en la zona infectada. Debido a los grandes inconvenientes de la vía sistémica, una alternativa es el uso de sistemas de liberación controlada en dicha zona. Como los patógenos fúngicos, fundamentalmente *Candida albicans*, han sido reconocidos como causas potenciales de osteomielitis (3), el objetivo de este trabajo ha sido el desarrollar y optimizar la preparación de un sistema de liberación de anfotericina B basado en microesferas biodegradables de poli-láctico-co-glicólico para la cesión sostenida del antifúngico a nivel local en la infección ósea.

Materiales y Métodos

Acido poli-DL-láctico-co-glicólico, con peso molecular medio en peso de 12 kD y relación 50:50 (PLGA, Resomer® RG502) adquirido a Boehringer Ingelheim KG, Alemania; desoxicolato-sódico (DXC) suministrado por Sigma® St. Louis, MO, USA y anfotericina B (AB) donada por Squibb Industria Farmacéutica, S.A.

Elaboración de las microesferas

Las microesferas de PLGA y anfotericina B fueron elaboradas por la técnica de evaporación del disolvente a presión atmosférica y temperatura ambiente.

Influencia del procedimiento de elaboración sobre la liberación del fármaco:

Preparamos 4 lotes de microesferas con el fin de estudiar el efecto del disolvente y de la agitación, empleados para dispersar la AB en la disolución del polímero, sobre la liberación del fármaco.

Los disolventes empleados fueron el diclorometano (DCM) (Merck) y el glicofurol 75 (Sigma®) que es un disolvente aceptado para su utilización en administración IV o IM hasta concentraciones de 50% v/v. Como sistema de agitación para la suspensión homogénea de la anfotericina B en el disolvente, empleamos un vortex y un sonicador (Sonicator® XL 2020) a una potencia de 42 watios (output 4).

En una disolución del PLGA en el disolvente (10% w/v) se dispersa la AB (20% w/w) empleando los distintos sistemas de agitación. Posteriormente esta suspensión se deja gotear sobre 200 ml de una disolución acuosa de PVA al 0,1%, de peso molecular 30000 – 70000 (Sigma®), agitada a 7000 rpm con un homogenizador (Silverson L 4 RT, vástago ¾) durante 5 minutos y se continúa con agitación magnética a 1000 rpm durante 2 horas con lo que se consigue la evaporación total del disolvente.

402 VI Congreso SEFIG y 3^{as} Jornadas TF

Las microesferas se separan por centrifugación (8000 rpm, 4 °C, 10 minutos) y posteriormente son congeladas a -80 °C y liofilizadas bajo las siguientes condiciones: temperatura del sistema, -40 °C; temperatura del condensador, -54 °C; vacío, 108 x 10⁻³ mBar durante aproximadamente 48 horas. Posteriormente se lleva a cabo una desecación secundaria durante 24 h a 20 °C.

Influencia de la carga y solubilizante sobre la liberación del fármaco:

Para estudiar el papel que juega la carga de anfotericina B y la presencia del desoxicolato-sódico sobre la cesión de aquella, elaboramos dos lotes de microesferas dispersando en la disolución del PLGA en DCM (10 % w/v) AB y DXC en proporciones de 20 y 40% w/w, lote 5 y 6, respectivamente.

El proceso de elaboración fue el mismo que se describió en el apartado anterior, pero usando el vortex para la dispersión homogénea de la anfotericina B en la disolución del polímero.

Los aspectos diferenciales en la elaboración de los distintos lotes de microesferas se recogen en la tabla 1.

Tabla 1.- Características de los lotes de microesferas elaborados por disolución del PLGA en distintos disolventes y forma de dispersar la anfotericina B: AB (%), porcentaje teórico de AB y DXC (%) porcentaje teórico de desoxicolato-sódico.

Lote	Disolvente	AB (%)	DXC (%)	Agitación
1	Glicofurol	20	0	Vortex
2	DCM	20	0	Vortex
3	Glicofurol	20	0	Sonicador
4	DCM	20	0	Sonicador
5	DCM	20	20	Vortex
6	DCM	40	40	Vortex

Determinación del contenido de anfotericina B

El contenido en AB de las microesferas se determinó mediante espectrofotometría a 327 nm en tampón fosfato pH 7,4 isotónico. El ensayo de uniformidad en contenido de AB se llevó a cabo tomando 3 muestras, de 25 mg, de cada lote de microesferas a las que se les añadió 5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck) para disolver la AB y 3 ml de tampón para precipitar el polímero.

Se centrifuga y se separa el sobrenadante para determinar su concentración en anfotericina. El proceso fue realizado cuatro veces para extraer completamente toda la AB. La eficiencia de contenido fue calculada como porcentaje de AB en las microesferas con respecto a la cantidad inicial empleada en la elaboración de las mismas.

Determinación del tamaño de partícula de las microesferas

La caracterización granulométrica de los diferentes lotes de microesferas se realizó mediante difracción de luz láser utilizando un equipo Coulter® LS100.

Ensayos de cesión in vitro

Para la realización de estos ensayos, las microesferas se incubaron en tampón fosfato pH 7,4 isotónico conteniendo 0,02% de azida-sódica. El sistema se mantuvo a 4 y 37 °C, con agitación horizontal a 50 rpm.

Los ensayos se realizaron por triplicado, para cada formulación y temperatura, en oscuridad. Para ello 20 mg de microesferas se suspenden en 10 ml de medio de cesión. A tiempos previamente establecidos se centrifugan las muestras, se extrae el sobrenadante y el precipitado se vuelve a resuspender con 10 ml de medio de cesión fresco. La anfotericina B cedida se valora por el método espectrofotométrico anteriormente descrito.

Resultados y Discusión

Las características de las microesferas obtenidas se recogen en la tabla 2.

Cuando se observaron las partículas al microscopio óptico, pudimos comprobar que sólo aquellas elaboradas con disolución del PLGA en diclorometano fueron partículas esféricas (microesferas), mientras que cuando se disolvió en glicofurol sólo obtuvimos micropartículas. También cabe destacar como el tamaño de partícula es menor al emplear el DCM, estando en un intervalo entre 2,7 y 7,8 µm, mientras que con el glicofurol las micropartículas son más grandes con tamaños de 16 y 36,6 µm.

En cuanto a la influencia de la elaboración (disolvente y agitación) en la cesión de la

anfotericina B desde las microesferas y micropartículas, podemos observar que para todos los lotes el perfil de cesión es el mismo, independientemente de la temperatura a la cual se desarrolla el ensayo (figuras 1 y 2). Cabe destacar que de las dos variables estudiadas, es el disolvente el que tiene mayor importancia, puesto que los perfiles con cada disolvente se solapan independientemente del proceso de agitación empleado.

Tabla 2.- Características de los lotes de microesferas: R.P., rendimiento de producción de microesferas; AB, porcentaje experimental de AB; E.E., eficiencia de incorporación de AB y *dmv*, diámetro medio en volumen.

Lote	R.P. (%)	AB (%)	E.E. (%)	<i>dmv</i> (mm)
1	71,3	13,0±0,4	78,0±2,6	36,6±3,9
2	85,7	11,1±0,1	66,4±0,6	2,8±0,1
3	73,3	11,4±1,1	68,5±6,8	16,1±4,1
4	82,3	9,7±1,4	58,3±8,9	3,3±0,1
5	70,1	10,7±0,9	75,0±6,4	7,8±2,9
6	70,9	11,1±0,4	49,8±1,9	7,7±1,7

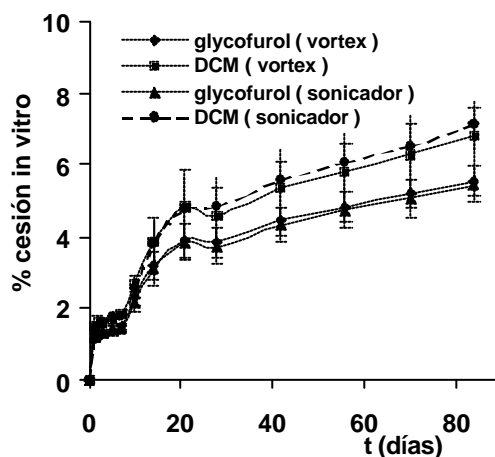


Figura 1.- Perfiles de cesión in vitro para los lotes 1, 2, 3 y 4 en tampón fosfato pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida-sódica y a 37°C. Influencia del procedimiento de elaboración

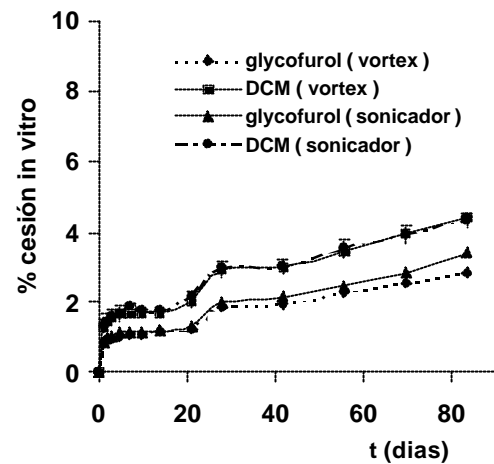


Figura 2.- Perfiles de cesión in vitro para los lotes 1, 2, 3 y 4 en tampón fosfato pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida-sódica y a 4°C. Influencia del proceso de elaboración.

También hay que resaltar que las microesferas, lotes elaborados con DCM, son las que dan lugar a una mayor cantidad de anfotericina B liberada, lo cual se explica por la mayor superficie específica que presentan éstas con respecto a las micropartículas. Esto sucede tanto en los ensayos a 37 °C (figura 1), siendo los porcentajes cedidos un 7 y 5,5 % para las microesferas y micropartículas, respectivamente, como en los ensayos a 4 °C (figura 2), donde los porcentajes cedidos son de un 4,4 % para las microesferas y aproximadamente un 3 % para las micropartículas, durante los 84 días que se mantuvieron los ensayos.

En cuanto a la influencia de la carga de anfotericina B y la presencia del DXC como solubilizante, observamos que, a 37 °C, y en contra de lo que cabría esperar, la formulación que presenta una velocidad de cesión más rápida y una mayor cantidad de AB cedida, es la que no fue elaborada con DXC (figura 3). Sin embargo, cuando el ensayo se realiza a 4 °C, los perfiles de cesión son similares no resaltando ninguno de los factores estudiados y siendo el porcentaje de AB liberado, en 84 días, del orden del 4% (figura 4).

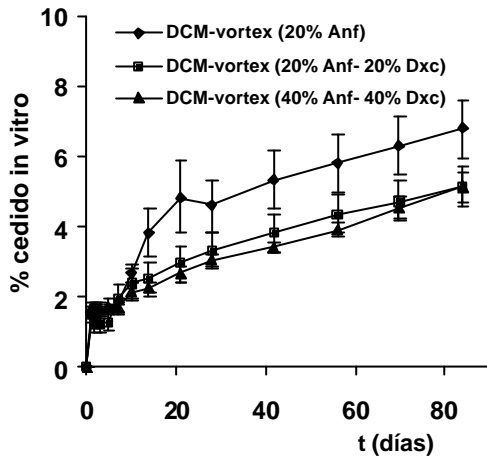


Figura 3.- Perfiles de cesión in vitro para los lotes 2, 5 y 6 en tampón fosfato pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida-sódica y a 37°C. Influencia de la carga.

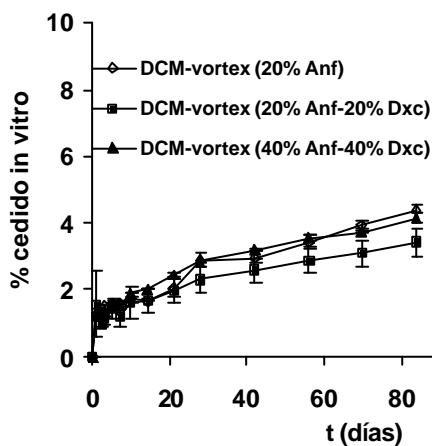


Figura 4.- Perfiles de cesión in vitro para los lotes 2, 5 y 6 en tampón fosfato pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida-sódica y a 4°C. Influencia de la carga.

Los perfiles de los lotes con el solubilizante son similares, con una cesión continuada, pero muy lenta, desde el principio del ensayo, liberándose sólo un 5 % durante los 84 días. El perfil de

cesión del lote 2, formulado sólo con anfotericina B, presenta una cesión ligeramente más rápida durante los primeros 21 días liberándose un 5 % y, posteriormente, la velocidad de cesión se iguala a la de los dos lotes con solubilizante (Lotes 5 y 6), liberándose a los 84 días solamente un 7 % de la cantidad total de anfotericina incorporada.

Los resultados obtenidos nos llevan a la conclusión de que debemos buscar otro tipo de sistema de cesión controlada, que libere el antifúngico a una velocidad más rápida para obtener niveles óptimos de AB, teniendo en cuenta que la CMI de la misma para *Candida albicans* es de 1 µg/ml.

Bibliografía

1. Rippon J.W.; Medical mycology, Sanders Co (1982)
2. Warnock D.W.; Amphotericin B: An introduction, J. Antimicrob. Chemother., 28 (Supp B), 27 (1991)
3. Marra F., Robbins G.M., Masri B.A., Duncan C., Wassan K.M., Kwong E.H., Jewesson P.J.; Amphotericin-B-loaded bone cement to treat osteomyelitis caused by candida albicans, Can. J. Surg., 44(5), 383 (2001)

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno Autónomo de Canarias como parte del Proyecto Nº PI2001/055.