

## MODIFICACIÓN DEL DIÁMETRO MEDIO DE MICROESFERAS LIPÍDICAS PORTADORAS DE MENADIONA A DIFERENTES TEMPERATURAS

Beatriz M<sup>a</sup> de Dios Jiménez, Pablo José Hernández Benavides y Antonio Cerezo Galán.

Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja s/n. 18071-Granada. España.

### Introducción

Las microesferas lipídicas son uno de los nuevos sistemas de transporte y liberación de fármacos capaces de incrementar la seguridad y eficacia de los principios activos que incorporan. Presentan ventajas frente al resto de vectores micro y nanoparticulares empleados en terapéutica e investigación, destacando sobre todo su elevada estabilidad (1). Son emulsiones grasas (O/A) donde la fase interna (inferior siempre a 1  $\mu\text{m}$ ) está constituida por aceite refinado de soja y lecitina de soja, incorporando en ocasiones colesterol como sustancia que actúa fortaleciendo las monocapas fosfolipídicas del sistema y un agente antioxidante como el acetato de DL-a-tocoferol. El medio externo es una solución de glicerina al 2,60 % (m/V) cuya función es mantener la isotonía del preparado. Las microesferas lipídicas se suelen administrar por vía parenteral intravenosa, aunque se han ensayado otras vías diferentes. Los principios activos encapsulados han sido antiinflamatorios esteroídicos y no esteroídicos, prostaglandinas bronco y vasodilatadoras, agentes inmunosupresores, citostáticos, etc. (2,3).

Dentro de la línea investigación iniciada en nuestro Departamento, donde se pretende la puesta a punto de una formulación de microesferas lipídicas, empleando menadiona o vitamina K<sub>3</sub> como sustancia activa tipo de naturaleza liposoluble y continuando con el estudio de estabilidad de estos sistemas a dos temperaturas diferentes (5 y 25 °C) (4-7), se presentan los resultados obtenidos sobre la variación en el diámetro medio de las

microesferas en función del tiempo, determinado mediante el empleo de la microscopía electrónica de transmisión (M.E.T.).

### Materiales y Métodos

Los materiales utilizados en la elaboración de las siete formulaciones de microesferas lipídicas portadoras de menadiona han sido: vitamina K<sub>3</sub> o menadiona (Sigma), aceite refinado de soja (Roig Farma), lecitina de soja (Roig Farma), colesterol (Guinama), acetato de DL-a-tocoferol (Roig Farma), glicerina (Roig Farma) y agua purificada. En la tabla 1 figura la composición de cada fórmula, expresando la concentración de cada uno de sus componentes en g/100 ml.

**Tabla 1:** Microesferas lipídicas portadoras de menadiona.

Fórmula (nº)	Concentración (g/100 ml)						
	AS	LS	COL	TW	GL	TOC	MEN
1	0,685	1,25	0,50	0,50	2,60		0,05
2	0,685	1,25		0,50	2,60		0,05
3	0,685	1,25	0,50		2,60		0,05
4	0,685	1,25			2,60		0,05
5	0,685	1,25	0,50	0,50	2,60	0,005	0,05
6	0,685	1,25	0,50	0,50	2,60	0,500	0,05
7*	0,685	1,25	0,50	0,50	2,60	0,500	0,05

AS: aceite refinado de soja; LS: lecitina de soja; COL: colesterol; TW: tween 80; GL: glicerina; TOC: acetato de DL-a-tocoferol; MEN: menadiona.

\* Fórmula ajustada a pH 8 (c.s. NaOH 0,1 N).

El método de obtención ha sido el establecido por Hernández y cols. (8), que consiste en la disolución por separado de los componentes de

ambas fases y posterior interposición de las mismas mediante el empleo de un agitador mecánico (Omni mixer; Sorvall; modelo 230) a 10000 r.p.m./0,5 min y 4000 r.p.m./15 min. Las microesferas se homogenizan por filtración (membranas Millipore® de 1,20 µm de diámetro de poro) y se completa el volumen final de cada muestra hasta 200 ml con agua purificada.

El ensayo de estabilidad ha durado 60 días, evaluando la modificación en el diámetro medio de estos vectores a los 0, 20, 40 y 60 días de su preparación. La caracterización se ha realizado mediante microscopía electrónica de transmisión, empleando como técnica fundamental de contraste la tinción negativa, con rejillas de carbono incorporadas de Formvar como agente que aporta estabilidad y flexibilidad al soporte y acetato de uranilo (pH= 4,5) como reactivo fundamental (9).

**Resultados y Discusión**

En las tablas 2 y 3 figuran los resultados obtenidos en el diámetro medio de las microesferas para cada una de las formulaciones elaboradas. La tabla 2 corresponde al estudio llevado a cabo a 25 °C y la nº 3 cuando se mantuvieron las muestras a temperatura de refrigeración (5 °C). Se midieron en cada caso 50 microesferas aproximadamente, correspondiendo el dato presentado a la media de dichas determinaciones acompañada de su desviación estándar.

**Tabla 2:** Diámetro medio (µm) de microesferas lipídicas portadoras de menadiona (25°C).

Tiempo (días)	Fórmula (nº)			
	1	2	3	4
0	0,030 ± 0,006	0,020 ± 0,005	0,100 ± 0,010	0,060 ± 0,010
20	0,050 ± 0,010	0,020 ± 0,005	0,100 ± 0,040	0,050 ± 0,010
40	0,050 ± 0,010	0,030 ± 0,006	0,100 ± 0,030	0,060 ± 0,020
60	0,050 ± 0,010	0,060 ± 0,010	0,160 ± 0,030	0,130 ± 0,030

Tiempo (días)	Fórmula (nº)		
	5	6	7
0	0,030 ± 0,010	0,050 ± 0,020	0,040 ± 0,009
20	0,040 ± 0,010	0,060 ± 0,010	0,040 ± 0,020
40	0,060 ± 0,020	0,070 ± 0,020	0,090 ± 0,009
60	0,090 ± 0,030	0,070 ± 0,009	0,040 ± 0,020

**Tabla 3:** Diámetro medio (µm) de microesferas lipídicas portadoras de menadiona (5°C).

Tiempo (días)	Fórmula (nº)			
	1	2	3	4
0	0,030 ± 0,006	0,020 ± 0,005	0,100 ± 0,010	0,060 ± 0,010
20	0,060 ± 0,010	0,030 ± 0,006	0,100 ± 0,030	0,090 ± 0,010
40	0,060 ± 0,010	0,050 ± 0,009	0,100 ± 0,030	0,100 ± 0,010
60	0,050 ± 0,010	0,070 ± 0,020	0,110 ± 0,040	0,180 ± 0,020

Tiempo (días)	Fórmula (nº)		
	5	6	7
0	0,030 ± 0,010	0,050 ± 0,020	0,040 ± 0,009
20	0,060 ± 0,020	0,050 ± 0,010	0,050 ± 0,008
40	0,070 ± 0,020	0,060 ± 0,010	0,070 ± 0,009
60	0,070 ± 0,020	0,080 ± 0,020	0,070 ± 0,007

En una primera aproximación, se observa como el diámetro medio de las microesferas elaboradas con el método anteriormente descrito

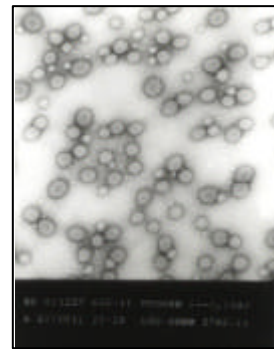
es muy reducido, siendo los valores extremos de  $0,020 \pm 0,005 \mu\text{m}$  correspondiente a la fórmula nº 2, que incorpora menadiona (0,05 g/100 ml), aceite refinado de soja (0,685 g/100ml), lecitina de soja (1,25 g/100 ml), tween 80 (0,50 g/100 ml) y glicerina (2,60 g/100 ml) y de  $0,100 \pm 0,010 \mu\text{m}$  para la fórmula nº 3, similar a la anterior excepto en que contiene tween 80 en su composición y sí colesterol, a la concentración de 0,50 g/100 ml.

Se aprecia la influencia positiva que ejerce el colesterol sobre la estabilidad de estos sistemas. Así, las microesferas correspondientes a la fórmula nº 3 anteriormente indicada, a pesar de presentar inicialmente el mayor diámetro medio, han mantenido constante dicho valor al menos durante cuarenta días a las dos temperaturas ensayadas (5 y 25 °C). Este hecho es significativo en ausencia de tween 80, como ya se observó en trabajos precedentes (10), ya que si se incorpora dicha sustancia (fórmula 1), se incrementa el tamaño de las microesferas a los veinte días de su elaboración, aunque posteriormente se mantiene constante.

Otro de los componentes de la formulación que puede afectar a la estabilidad de las microesferas lipídicas es el acetato de DL-tocoferol. Su incorporación a la fórmula a dos concentraciones diferentes (0,005 % m/V, fórmula 5 y 0,50 m/V, fórmulas 6 y 7), ha aportado los siguientes resultados: a 25 °C, se aprecia un aumento gradual en el diámetro medio de las microesferas; en cambio, a 5 °C, las fórmulas 6 y 7 mantienen más o menos constante su tamaño inicial ( $0,050 \pm 0,020 \mu\text{m}$  y  $0,040 \pm 0,009 \mu\text{m}$  respectivamente) durante los primeros veinte días, hecho que no sucede con la fórmula nº 1, que difiere solamente de la nº 6 en la ausencia de dicha sustancia, o con la fórmula nº 5, donde solamente se incorpora el 0,05 % de dicho agente antioxidante. En ambos casos el tamaño medio se incrementa notablemente a los veinte días de la elaboración de la fórmula.

La figura 1 es un ejemplo de una microfotografía (50000 x) correspondiente en este caso a la fórmula nº 7 a los veinte días de su elaboración y mantenida a 25 °C. Se aprecia la presencia alrededor de las microesferas de un halo más

refringente debido a la disposición en monocapa de la lecitina que actúa como agente tensioactivo. El tamaño es reducido y homogéneo, aspectos muy importantes para la estabilidad del sistema.



**Figura 1:** Microesferas lipídicas portadoras de menadiona a los 20 días de su elaboración (50000 x).

### Bibliografía

1. Mizushima, Y., Adv. Drug Del. Rev., 20, 113, (1996).
2. Mizushima, Y., Drugs Exp. Clin. Res., 13 (11), 689, (1987).
3. Takenaga, M., Adv. Drug Del. Rev., 20, 209, (1996).
4. de Dios, B.M., Hernández, P.J. y Cerezo, A., 1er Congreso Virtual sobre Farmacia, 39, Granada, 1998.
5. de Dios, B.M., Hernández, P.J. y Cerezo, A., 23RD International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. HPLC '99, (II), PB 15/25, Granada, 1999.
6. de Dios, B.M., Hernández, P.J. y Cerezo, A., World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences '99. 59th International Congress of FIP, P-006, Barcelona, 1999.
7. de Dios, B.M., Hernández, P.J. y Cerezo, A., V Congreso de la SEFIG, 79, Valencia, 2001.
8. Hernández, P.J., Medina, M.M., Cerezo, A. y Sánchez, J., Pharmaklinik, 3 (4), 168, (1989).
9. Megías, L. y Renau, J., Tinción Negativa en "Manual de Microscopía Electrónica (M.E.T.). Aplicaciones Biológicas (Fundamentos y Procedimientos). Ed. Universidad de Granada, Granada, 1988.
10. Hernández, P.J. y Cerezo, A., Cien. Pharm., 7 (1), 12, (1997).

## 262 VI Congreso SEFIG y 3<sup>as</sup> Jornadas TF

*Autor de contacto:*

*Pablo José Hernández Benavides.*

[pabloj@ugr.es](mailto:pabloj@ugr.es)

*Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica.*

*Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.*

*Campus Universitario Cartuja, s/n.*

*18071-Granada (España).*

*Tel.: 958249546.*

*Fax.: 958248958.*