

Perfil de liberación de indometacina desde acuosomas utilizando el método de diálisis

Release behaviour of indomethacin from aquasomes using a dialysis method

Irma Rojas-Oviedo ¹, Adriana López Torres¹, Carlos Quirino Barreda ¹, Hilda Cárdenas Rodríguez¹,
Ramiro García García²

¹Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

²Instituto de Física. Universidad Nacional Autónoma de México

Resumen

El objeto del trabajo fue cuantificar la liberación de Indometacina (I), fármaco modelo de baja solubilidad, contenido en Acuosomas (A), mediante un método de diálisis y espectroscopia UV. La caracterización estructural se efectuó mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido, así como por calorimetría diferencial de barrido y espectroscopia de infrarrojo. El tamaño de partícula de los aglomerados de acuosomas están en el intervalo de 3 a 4 μm con un promedio de 3.68 μm y un error estándar de la media de 0.0082. En comparación con la mezcla física (PM) los acuosomas liberaron en los primeros veinte minutos, doce veces más indometacina y durante 24 h, se mantuvo esta liberación en una relación 1.6 a uno. El infrarrojo y la calorimetría indican la formación de interacciones entre las moléculas dentro de los acuosomas.

Abstract

The aim of this work was to determine the release behavior of Indomethacin (I), a low solubility drug model, from Aquasomes (A) through a dialysis methodology and UV-spectroscopy. Structural characterization was evaluated by transmission and scanning electron microscopy, differential scanning calorimetry, and infrared spectroscopy. The particle size analysis of the clusters of aquasomes indicated an average particle size in the range of 3 to 4 μm , with a media of 3.68 μm , and the standard error of the media 0.0082. Within the first twenty minutes aquasomes released twelve fold more indomethacin than the physical mixture (PM) of the compounds. The release was sustained over twenty hours in a ratio 1.6 to 1. Infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry, results point out about interactions between molecules inside the acuosomes.

Palabras clave: acuosomas, diálisis, liberación, microscopía electrónica, espectroscopia infrarrojo.

Key words: aquasomes, dialysis, drug release, electron microscopy, infrared spectroscopy.

Correspondencia:

Dra. Irma Rojas Oviedo
Departamento de Sistemas Biológicos. UAM-Xochimilco,
Calzada del Hueso 1100, Col Villa Quietud,
Coyoacán, México D.F. C.P. 04690
Tel 5483 7350 ext 3634
Fax 5594 7929
e-mail: irma19@correo.xoc.uam.mx

Fecha de recepción: 18 de octubre de 2011
Fecha de recepción de modificaciones: 16 de noviembre de 2011
Fecha de aceptación: 12 de enero de 2012

Introducción

De los dos métodos generales existentes para obtener micro y nanopartículas, como son micronización y precipitación,¹ se sabe que el último evita problemas tales como una distribución abierta de tamaño de partículas, contaminación del fármaco a través de la molienda y la inestabilidad térmica por los materiales utilizados.²⁻⁷ Con las técnicas de precipitación, el diseño de acuosomas tiene la ventaja de permitir disponer de un área superficial grande y brindar una estabilidad mayor para el fármaco en ambientes hidrofílicos,⁸ con lo cual se incrementa la velocidad de su disolución mejorando el efecto farmacológico del mismo. Los acuosomas son sistemas micro- o nanoparticulados compuestos de un núcleo inorgánico cubierto por compuestos polihidroxilados sobre los que se deposita el fármaco y este acoplamiento es favorecido por la formación de los enlaces no-covalentes entre los componentes.⁹

El objetivo de este trabajo fue determinar los perfiles de liberación del fármaco modelo incorporado al acuosoma, mediante un método de diálisis, comparando la liberación con el fármaco puro y con una mezcla física (PM) de los componentes del acuosoma.

El método de diálisis ha sido probado con sistemas liposomales en los que la precisión es aceptable.¹⁰ De aquí que sea utilizado en nuestro caso pues permite el paso selectivo del fármaco en sistemas micro, de modo que se puedan establecer perfiles de liberación de indometacina en función del tiempo.

Material y método

Materiales

CaCl_2 , NaH_2PO_4 y Etanol fueron adquiridos de manera comercial (J.T. Baker). Agua bi-distilada. La lactosa (Lactochem) e Indometacina 99% (Auzohu-Konch Pharmaceutica) fueron de calidad farmacopéica.

Método de preparación de los acuosomas

El diseño de los acuosomas involucra tres etapas, primeramente se obtiene un núcleo inorgánico, seguido por un recubrimiento con una capa de lactosa y finalmente se lleva a cabo la incorporación del fármaco.¹¹

El núcleo inorgánico se obtiene mediante una reacción entre soluciones a igual volumen de NaH_2PO_4 (0.25 M) y de CaCl_2 (0.75 M) manteniéndose en sonicación por una hora (Vibracell Sonios VC 600-2). Los núcleos inorgánicos se resuspenden en un mL de agua bi-distilada y se le añaden 100 mL de una solución 9.4×10^{-5} M de lactosa (L). Este sistema se agita por 90 min y se filtra a través de una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0.22μ ; posteriormente se liofiliza (Labconco serie 67974). obteniendo la nano, o en su caso, la micropartícula

hidroxilada, la cual se dispersa en agua bidestilada y se mezcla con una solución 3.57×10^{-5} M de indometacina (I) disuelta en una mezcla de etanol:agua (1:5). En cada etapa, las dispersiones se pasan a través de un filtro de membrana ($0.22 \mu\text{m}$) para ser liofilizado nuevamente. La identificación de los núcleos fue mediante difracción de polvos de rayos X.¹¹

Microscopía

La morfología y distribución del tamaño de partícula en cada etapa, se determinó por medio de la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) usando un instrumento JEOL JSM-5600.

Análisis Térmico

La calorimetría de barrido diferencial (DSC) se realizó con un instrumento Perkin Elmer (Mod DSC7) calentando a velocidades de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ bajo un flujo de nitrógeno, en un intervalo de 50 a 260°C . La calibración se efectuó con Indio.

Espectroscopia de Infrarrojo FT

Los espectros de infrarrojo se llevaron a cabo en un espectrofotómetro (Bruker Modelo Tensor 27) en tabletas de KBr.

Perfiles de liberación.

Los perfiles de liberación se efectuaron por la técnica de tubos de diálisis¹² (Spectrapor de peso molecular de 2 kDa). Los acuosomas conteniendo 1mg/mL de (I) fueron disueltos en una mezcla de agua bi-distilada y solución amortiguadora 0.2 M de fosfatos pH 7.2 en una relación 5:1. Esta solución se vertió en un tubo de diálisis y se colocó en un medio (250 mL) conteniendo la misma mezcla de disolución. El sistema se agitó lentamente a 37°C durante 48 h protegiéndolo de la luz. Se tomaron muestras de 3 mL a diferentes tiempos: 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 1440 min (24 h). La absorbancia se midió a 318 nm (espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu Mod 1201), y se estableció la concentración utilizando una curva de calibración de una solución de (I) de concentración conocida. Los experimentos se realizaron por triplicado.

La concentración de (I) en los acuosomas se determinó a partir de cálculos estequiométricos y moleculares asumiendo un área superficial para los núcleos, de entre 100 y 400 nm.

Resultados y discusión

La microfotografía MEB de la Figura 1 muestra a los acuosomas ($L = 9.4 \times 10^{-5}$ M, $I = 3.57 \times 10^{-5}$ M) en forma de aglomerados de tamaño promedio de $3.68 \mu\text{m}$ con una desviación estándar de $0.0082 \mu\text{m}$, sin embargo, las estructuras esféricas que los conforman son de un tamaño que oscila alrededor de las $0.5 \mu\text{m}$, lo que podría considerarse dentro del intervalo de nanopartículas.

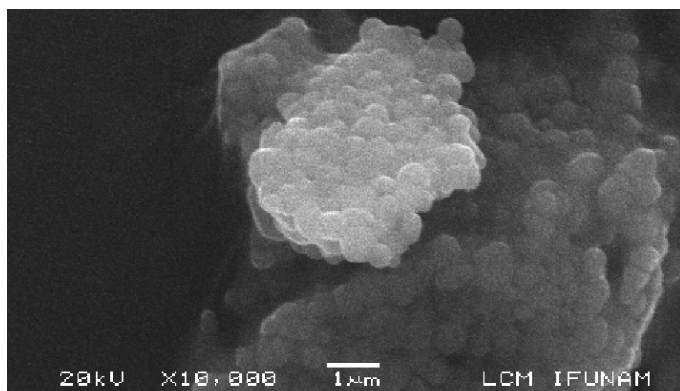


Figura 1. Microfotografía de los aglomerados de acuosomas y la distribución del tamaño de partícula.

[L] 9.4×10^{-5} M [I] 3.57×10^{-5} M

DE: error estándar de la media

Tamaño \pm DE $3,68 \pm 0,0082 \mu\text{m}$ $n = 684$ partículas.

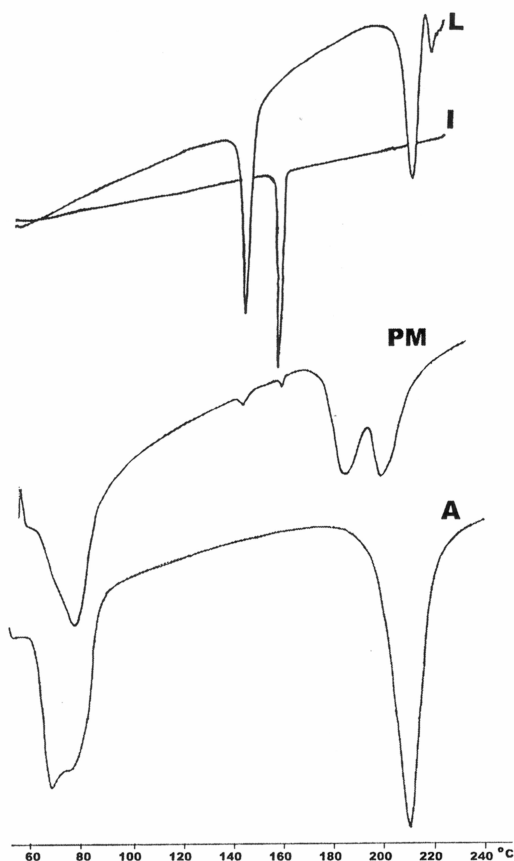


Figura 2. Termogramas de Lactosa (L), Indometacina pura (I), la mezcla física de L+I+ fosfato de calcio (PM) y el acuosoma (A).

La Figura 2 muestra los termogramas de (I) y de (L). La indometacina (I), presenta sólo una endoterma (162°C) correspondiente a la fusión de la misma. Por su parte, (L) presenta una señal a 151°C que está asociada a la pérdida de agua, y una señal a 219°C que corresponde a la fusión de (L). En el intervalo de estudio en el cual se analizaron las muestras ($50 - 260^{\circ}\text{C}$), no se observó señal alguna correspondiente al núcleo inorgánico de fosfato de calcio. A su vez, se estudió el comportamiento de la mezcla física (PM) de núcleo inorgánico, (L) e (I), la cual muestra pequeñas señales a 148°C y 160°C , que pueden atribuirse a la (L) e (I) respectivamente, así como tres endotermas anchas a 75 , 190 y 203°C , que pudieran resultar de las interacciones entre los componentes. La existencia de interacciones entre (L) e (I) ya han sido informadas en la literatura.¹³ Por su parte, los acuosomas (A) muestran una endoterma ancha a 77.9°C y un punto de fusión a 205.6°C . El perfil de este termograma apunta a un arreglo molecular distinto entre los compuestos orgánicos al presentado por la mezcla física (PM).

La Figura 3 muestra los espectros de infrarrojo -FT del núcleo inorgánico de fosfato de calcio (CP), la mezcla física (PM) de los componentes del acuosoma y las señales de los acuosomas (A).

Se sabe que el grupo fosfato presenta bandas que van de 1090 a 1030 y de 600 a 560 cm^{-1} ,¹⁴ y que en el caso de la muestra (CP) se localizan a 1069.48 y 518.18 cm^{-1} . Las bandas del grupo hidroxilo libre y asociado se observan a 3444.9 , 3379.8 cm^{-1} y 3130.8 cm^{-1} respectivamente, y se traslapan en la zona donde aparecen señales de (I).¹⁵⁻¹⁷ Aún cuando las bandas de (CP) son intensas, (PM) se alcanzan a definir las bandas en 1712.97 y 1690.39 cm^{-1} características de los grupos carbonilos de indometacina.

Una meticulosa observación de los espectros de infrarrojo permite ver las diferencias entre las muestras. Algunos ejemplos son la banda intensa por arriba de los 3100 cm^{-1} en el espectro de los acuosomas que pudiera adscribirse a puentes de hidrógeno intramoleculares y que apenas son visibles en las muestras (CP) y (PM).¹⁸ Otras diferencias están en la zona de huellas dactilares en donde la banda en 1075 cm^{-1} presente en (CP) y (PM), cambia de intensidad en el espectro de los acuosomas (1071 cm^{-1}). En los acuosomas aparece una nueva señal a 536 cm^{-1} además de la señal en 519 cm^{-1} presente en (CP) y (PM). Estos resultados proporcionan una evidencia más de que en los acuosomas, la organización de las moléculas es distinta a la que presenta la mezcla física.

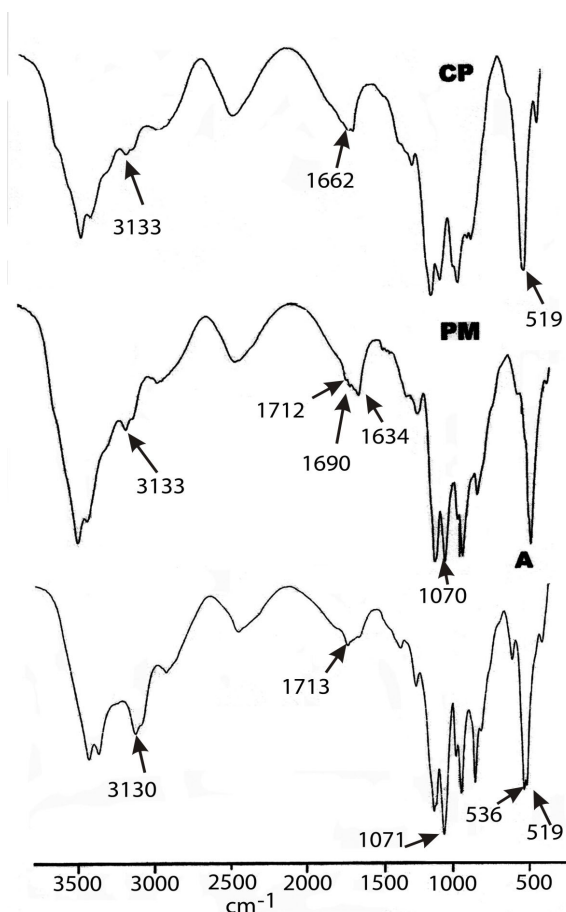


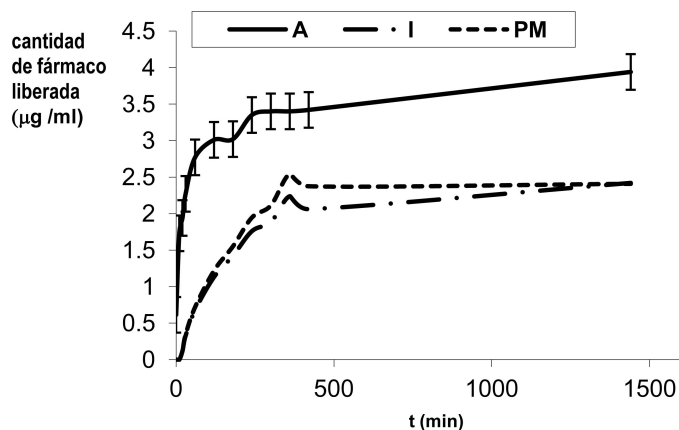
Figura 3. Espectros de Infrarrojo- FT del fosfato de (CP), mezcla física (PM) y acuosomas (A) en KBr.

La Lamina 1 muestra el comportamiento de liberación tanto de (I), (PM) y de (A). En comparación con la mezcla física (PM) los acuosomas liberaron en los primeros veinte minutos, doce veces más indometacina. A partir de los 400 minutos y hasta las 24 horas, se mantuvo esta liberación en una relación 1.6 a uno.

Una ligera mejora en la solubilidad en el caso de la muestra física, puede explicarse en función de que la lactosa es capaz de formar puentes de hidrógeno con los grupos carboxilo de la indometacina y esta interacción favorece la humectación del fármaco.

Mientras que el aumento en la solubilidad en los acuosomas, puede deberse a que al ser una estructura con mayor área superficial, esto propicia que un mayor número de moléculas de lactosa se depositen ordenadamente en el núcleo inorgánico a través de los enlaces no-covalentes y esto favorece también la generación de un mayor número de puentes de hidrógeno entre la moléculas del fármaco y las moléculas de lactosa, que puede reflejarse por la intensidad de la banda de infrarrojo por arriba de 3100 cm^{-1} .

Lamina 1. Perfiles de disolución de Indometacina (I), mezcla física (PM) y acuosomas (A).



Conclusiones

Los acuosomas son una opción muy interesante para mejorar la liberación de fármacos poco solubles, a fin de mejorar su biodisponibilidad, pues ofrecen un entorno propicio para los mismos en ambientes hidrofílicos. Como se esperaba, se registró un aumento en la disolución del fármaco utilizado. Este aumento se atribuye al mayor número de puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la indometacina y los grupos hidroxilo de la lactosa ordenados en los acuosomas lo que pudo reflejarse en la intensidad de la banda de infrarrojo arriba de 3100 cm^{-1} . La técnica de diálisis utilizada, permitió cuantificar la cantidad de fármaco liberado tanto en la mezcla física como en los acuosomas.

Agradecimientos

A Samuel Thehuacanero por los análisis MEB y a Rocío Patiño por los espectros IR.

Referencias

1. Eerikäinen H, Kauppienen E, Kansikas J. Polymeric drug nanoparticles prepared by an aerosol flow reactor method. *Pharm Res.* 2004; 21(1):136-143.
2. Wang N, Shen X, Li JA. Heterogeneously structured composite based on Poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres and Poly(vinyl alcohol) hydrogel nanoparticles for long-term protein drug delivery. *Pharm Res.* 1999; 16(9):1430-1435.
3. Okacova L, Vtchy D, Franc A, Rabiskova M, Kratochvil B. *Ustav. Chemicke Listy.* 2010; 104(1):21-26.

4. Jeong Y, Jae-Woon N, Han-Kwang N, Kun N, In-sook K, Chong-Wu C, Sung-Ho K. Self-assembling nanospheres of hydrophobized pullulans in water. *Drug Develop Ind Pharm*. 1999; 25(8):917-927.
5. Alvarez-Román R, Naik K, Guy F. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharm Res*. 2004; 21(10):1818-1824.
6. Illing A, Unruh T, Kock M. Investigation on particles self-assembly in solid lipid-based colloidal drug carrier system. *Pharm Res*. 2004; 21(4):592-597.
7. Mainardes RM, Urban MCC, Cinto P O, Khalil N M, Chaud MV, Evangelista RC, Daflon GMP. Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery. *Curr Drug Targets*. 2005; 6(3): 363-371
8. Kossovsky N, Gelman A, Sponsler E E, Hnatyszyn H J, Rajguru S, Torres M, Pham M, Crowder J, Zemanovich J, Chung A, Shah R. Surface-modified nanocrystalline ceramics for drug delivery applications *Biomaterials*. 1994; 15(15):1201-1207.
9. Min H, Cai-Xia H, Qui-Li F, Xiao-Chun Y, Yuan-Yuan D, Dong-Hang X, Qiao-Jun H, Yong-Zhou H, Wen-Quan L, Bo Y, Jian-Quing G. A novel Camptothecin Derivative Incorporated in Nano-Carrier Induced Distiguated Improvement in Solubility, Stability and Antitumor Activity both in Vitro and In Vivo. *Pharm Res*. 2009; 26(4):926-935.
10. Shazly G, Nawroth T, Langguth P. Comparison of dialysis and dispersion methods for in vitro release determination of drugs from multilamellar liposomes. *Dissolution Technologies*. 2008; 15(2):7-10.
11. Rojas-Oviedo I, Salazar López RA, ReyesGasga J, QuirinoBarreda CT. Elaboration and structural analysis of aquasomes loaded with indomethacin. *Eur J Pharm Sci*. 200; 32:223-230.
12. Itoh S, Teraoka N, Matsuda T, Okamoto K, Takagi T, Oo Ch, Danny Kao H. Reciprocating dialysis tube method: Periodic tapping improved in vitro release /dissolution testing of suppositories. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006; 64(3):393-398.
13. Sungthongjenn S, Sriamornsak P, Pitaksuteepong T, Somsiri A. Effect of degree of esterification and calcium amount on drug release from pectin-based matrix tablets. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2004 5(1):1-8 article 9.
<http://www.aapspharmscitech.org/>. Acceso Julio 2011.
14. Lai C, Tang S, Wang Y, Wei K. Effect of degree of esterification and calcium amount on drug release from pectin-based matrix tablets. *Mater Lett*. 2005; 59:210-214.
15. Otsuka M, Kato F, Matsuda Y. Comparative evaluation of the degree of indomethacin crystallinity by chemoinformetrical Fourier - transformed near- infrared spectroscopy and conventional powder X-Ray diffractionmetry. *AAPS Pharmsci*. 2000; 2(1):1-8 article 9.
<http://www.pharmsci.org/>. Acceso: Julio 2011.
16. Androniss V, Zografi G. Crystal nucleation and growth of indomethacin polymorphs from the amorphous state. *J Non-Cryst Solids*. 2000;271:236-248.
17. Drapier-Beche N, Fanni J, Parmentier M. Physical and chemical properties of molecular compounds of lactose. *J Dairy Sci*. 1999; 82(12):2558-2563.
18. Kuo S-W, Wu Y-C, Wang C-F, Jeong K-U. Preparing low-surface-energy polymer materials by minimizing intermolecular hydrogen-bonding interactions. *J Phys Chem C*. 2009; 113:20666-20673.