

ESPECIFICACIONES TECNOLOGICAS PARA LA OBTENCION DE LIPOSOMAS UNILAMELARES

L. Caveda, X. Alvarez, J. Padrón y M. Palacios.

Centro de Química Farmacéutica, Calle 200 y 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 28 de marzo de 1991.

RESUMEN. Se aplicó el diseño de planes factoriales de Box y Willson al proceso de obtención de liposomas unilamelares, con la finalidad de optimizar las propiedades de esta nueva forma farmacéutica, con la cual se persigue la disminución de la toxicidad del principio activo y la prolongación de su efecto farmacológico en un sitio específico del organismo. Estas propiedades, así como su estabilidad farmacéutica dependen del tamaño de partícula, por lo que éste, se definió como variable dependiente en el polinomio lineal obtenido, donde los coeficientes de las variables independientes: temperatura del baño de rotoevaporación, la polaridad del solvente, tiempo de agitación, amplitud y tiempo del ultrasonido fueron significativos.

ABSTRACT. Box and Willson factorial design was applied to technological production process of unilamellar liposomes for the optimization of this new pharmaceutical form qualities: lowering of drug toxicity and prolongation of its targeting pharmacological effect. Particle size was selected as a dependent variable for the linear polynomial obtained, as pharmaceutical stability and other qualities above depends on it. Coefficients of independent variable: rotoevaporator bath temperature, solvent polarity, stirring time, amplitude and time of ultrasonication were significant.

INTRODUCCION

La posibilidad de incluir ciertos medicamentos en liposomas¹ o microesferas formadas por bicapas lipídicas la capacidad de dispersión en un medio acuoso de características coloidales, ha permitido el desarrollo de una nueva forma farmacéutica de avanzada, con la que se logra una disminución de la toxicidad sistémica del principio activo al poder localizar su efecto en las células blanco que lo atrapan y una prolongación de la acción terapéutica al distribuirse el medicamento por el organismo protegido de los efectos del metabolismo.

Para optimizar las propiedades que le confieren sus particularidades como forma farmacéutica, es necesario considerar la naturaleza biodegradable de sus bicapas lipídicas, sus características superficiales y el tamaño de las partículas.

En dependencia del tamaño de sus partículas, los liposomas se clasifican como: vesículas unilamelares (VUL) [las cuales se subdividen a su vez, en unilamelares grandes de 70-200 nm y pequeñas de 20-50 nm] y vesículas multilamelares (VML) de 400-3 500 nm. Por otra parte, desde el punto de vista del proceso tecnológico, se reportan mayores ventajas en la obtención de las VUL con relación a las VML, en cuanto a eficiencia de encapsulación, siendo el rendimiento de 1-80% para las VUL y de 5-20% en el caso de las VML.²

Se han desarrollado diversos métodos para la obtención de liposomas con alta eficiencia de encapsulación y un pequeño tamaño de partícula que le confieren una mayor estabilidad física, química y biológica.

Los métodos más utilizados en la actualidad son los de dispersión simple, deshidratación-rehidratación y congelación-descongelación para la producción de VML y los de sonicación, extrusión secuencial e inversión de fase para producir VUL.⁴⁻⁸

La regulación del tamaño de partículas adquiere considerable importancia porque permite aumentar el rendimiento del proceso, la estabilidad del sistema evitando la floculación y la posibilidad del paso por las barreras endoteliales.⁹

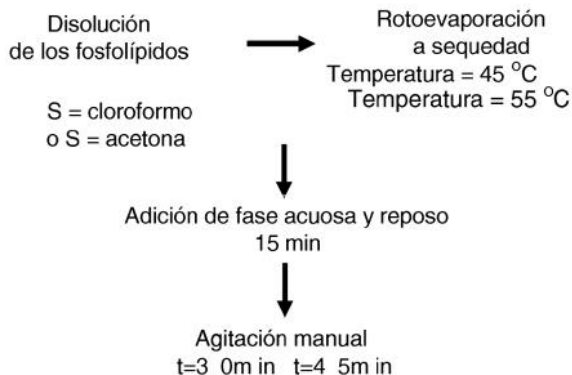
El objetivo del presente trabajo fue utilizar el diseño experimental de planes factoriales, así como el análisis de regresión lineal múltiple, para determinar la influencia de factores y operaciones durante el proceso de obtención de liposomas unilamelares que determinen un menor tamaño de partículas.

MATERIALES Y METODOS

En el proceso fueron utilizados la fosfatidilcolina (FC) o lecitina de huevo (Instituto "Carlos J. Finlay"), el colesterol (CHOL) (Fluka AG) y la estearilamina (SA) de producción nacional.

El método utilizado para la producción de VUL a partir de VML por sonicación seguía el flujo operacional siguiente:

MODELO 1



MODELO 2

Sonicación bajo condiciones preliminares de ensayo:
Temperatura: 20 °C y 10 °C
Amplitud: 27,5 y 55 µm
Tiempo: 5 y 10 min

A partir de los resultados, donde se definen las condiciones favorables de la primera fase de obtención de liposomas, se propone el estudio de los parámetros que intervienen en la sonicación, mediante el modelo 2.

La composición de la bicapa lipídica se determinó por la relación molar de sus componentes para un volumen total de 10mL, siendo para la FC (30 μmol), Chol (20 μmol) y SA (11 μmol), los cuales fueron disueltos en 5 mL de cloroformo.^{4, 5, 10}

Como fase acuosa se utilizó 10mL de amortiguador fosfato 10 mmol/L (pH 7,4) con 0,9 % NaCl.

El ultrasonido se realizó utilizando el Soniprep 150M SE y para determinar el tamaño promedio de las partículas fue utilizado el método turbidimétrico,¹¹ las mediciones se efectuaron en un Photoelectric Colorimeter AE33D Erma Optical Norks, con filtros de 620y 660nm .

La comprobación del tamaño y forma de las partículas obtenidas fue por microscopia electrónica, mediante el método de tinción egativac on molibdatod ea monio al2%.

En el procesamiento estadístico de los datos de ambos modelos(TablasI y II) se realizó el cálculo de la varianza del error puro mediante dos réplicas en cada punto.

TABLA I
Modelo de la matriz para un plan factorial 2³ en el modelo 1

	X ₁	T (°C)	X ₂	SX	3	t (min)
Y _i = (i=8)	-1	45	-1	CL	-1	30
	1	55	1	CL	1	30
	-1	45	1	AC	-1	30
	1	55	1	AC	-1	30
	-1	45	-1	CL	1	45
	15	5	-1	CL	1	45
	-1	45	1	AC	1	45
	15	5	1	AC	14	5

T temperatura; S solvente; t tiempo.
CL cloroformo; AC acetona.

TABLA II
Modelo de la matriz para un plan factorial de 2³ en el modelo 2

	X ₁	T (°C)	X ₂	AX	3	t (min)
Y _i = (i=8)	-1	10	-1	27,5	-1	5
	1	20	1	27,5	-1	5
	-1	10	1	55,0-1		5
	1	20		55,0	-1	5
	-1	10	-1	27,5	1	10
	1	20	1	27,5	1	10
	-1	10		55,01		10
	12	01		55,011		0

T temperatura; A amplitud; t tiempo.

El cálculo de los coeficientes del modelo se realizó mediante el sistema matricial¹²

$$a = (X'X)^{-1} X'Y$$

donde:

a vector de coeficientes del modelo

x matriz de variables independientes

y vector de resultados.

Los coeficientes significativos se determinaron mediante un programa de computación en lenguaje BASIC.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los vectores de rendimiento que se obtuvieron para el modelo 1, los cuales representan el valor promedio del tamaño de las partículas de las dos réplicas realizadas para cada experimento, expresados en nm, son los siguientes:

$$Y[1] = 58,0$$

$$Y[2] = 88,9$$

$$Y[3] = 91,9$$

$$Y[4] = 150,0$$

$$Y[5] = 38,0$$

$$Y[6] = 29,4$$

$$Y[7] = 115,9$$

$$Y[8] = 98,0$$

Los vectores de coeficientes que se obtuvieron fueron los siguientes:

Coefficientes	Valores
a ₀	83,804
a ₁	7,816
a ₂	30,183
a ₃	-13,436
a ₁₂	2,251
a ₁₃	-14,442
a ₂₃	6,443
a ₁₂₃	-4,570

Para un t-crítico * Sa(i) de 2,306.

Los coeficientes que resultaron significativos fueron: a₀, a₁, a₂, a₃ ya a₁₃.

La ecuación obtenida con los anteriores coeficientes es:

$$Y = 84 + 7,8X_1 + 30X_2 - 13X_3 - 14X_1X_3$$

Por el valor absoluto de los coeficientes significativos se puede inferir que la variable de mayor influencia sobre el tamaño de las partículas, fue el solvente orgánico empleado.

En el proceso de agregación de los fosfolípidos existe una tendencia del medio acuoso circundante a adquirir el estado de máxima entropía; donde las bicapas lipídicas se disponen de forma tal que reducen al máximo la exposición de sus cadenas hidrocarbonadas al medio acuoso.¹¹

Este proceso puede estar favorecido por la conformación particular que adquiera la mezcla de fosfolípidos en el proceso de rotoevaporación determinado por las características del solvente. En este caso particular, la diferencia existente entre los tamaños de partícula obtenidos con cloroformo y acetona, sugiere que la disminución está dada por un aumento de la polaridad.

La temperatura durante el proceso de rotoevaporación se fijó en un intervalo estrecho, con valores extremos de 45 y 55 °C, sin embargo, esta diferencia fue suficiente para determinar la significación del coeficiente de esta variable indicando que no sólo es suficiente sobrepasar la temperatura crítica de los fosfolípidos, donde sus cadenas acílicas son líquidas permitiendo la transformación de un estado ordenado gel a

uno más desordenado llamado cristalino-líquido,¹³ sino que puede determinar la formación de liposomas cualitativamente mejores. Es bueno señalar que en el modelo de trabajo las dos temperaturas empleadas estaban por encima de la crítica y que este parámetro, es específico para cada fosfolípido.

Estos valores sugieren la utilización de la temperatura menor (45 °C), del cloroformo como solvente y del tiempo máximo de agitación manual (45 min) como condiciones a fijar en el proceso de producción.

Sin embargo, la obtención de un coeficiente negativo para la interacción del efecto de la temperatura del baño durante la rotoevaporación y el tiempo de agitación indican que a mayores temperaturas y tiempo de agitación, se satisface que sean negativos los términos referentes al tiempo de agitación y a la interacción 1-3, cuyos coeficientes son mayores que el correspondiente a la temperatura del baño, lo cual es el objetivo de este trabajo, lograr un menor tamaño de las partículas.

Por otra parte, la gran dispersión en los valores obtenidos para el modelo 2 determinaron una varianza del error puro muy elevada, derivándose de esto la no significación de ninguna de las variables analizadas.

No obstante, en vista de que los valores de los coeficientes de cada variable estaban próximos a $t_{crit} \cdot Sa(i)$ físicamente, era de esperar que las variables del segundo modelo sí resultaran de significativa participación en el proceso, por lo que se decidió realizar el análisis de regresión lineal múltiple paso a paso para los resultados del diseño.

La temperatura resultó la variables que mayor correlación mostró con el tamaño de partícula (con un coeficiente de correlación parcial $r = 0,72$), no siendo así, para las variables amplitud y tiempo que arrojaron coeficientes de correlación parcial con valores muy bajos.

Se realizó además, la regresión considerando las tres variables. El resultado arrojó un coeficiente de correlación múltiple significativo ($r = 0,87$). Todo lo cual indica que estos factores, sí influyen en el tamaño de partícula en la relación siguiente.

$$Y = 72,50 + 3,95X_1 - 3,60X_2 - 3,80X_3$$

Finalmente, se analizó el comportamiento del tamaño de partícula en relación con la amplitud de la onda ultrasónica, para un tiempo de exposición constante, a través de un análisis de regresión para una $p = 0,05$.

El gráfico obtenido a partir de la ecuación de regresión permite definir un intervalo de amplitudes de la onda ultrasónica entre 50 y 65 μm para lograr partículas entre 40 y 80 nm (Fig. 1).

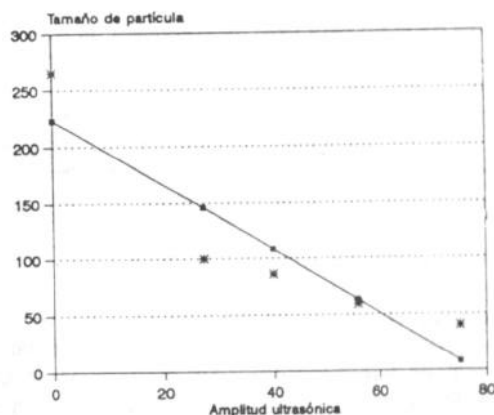


Fig. 1. Regresión lineal para las variables: tamaño de partícula y amplitud ultrasónica.

Se hace necesaria la aplicación de este sistema factorial para optimizar la eficiencia de encapsulación de los liposomas con el objetivo de disminuir la pérdida de principio activo no encapsulado durante el proceso de fabricación.

CONCLUSIONES

Se demostró que la temperatura del baño, el solvente utilizado y el tiempo de agitación manual durante la rotoevaporación de los componentes lipídicos, tienen influencia significativa sobre el tamaño promedio de partícula durante la primera etapa del proceso de obtención de las VML.

El intervalo de amplitudes de la onda ultrasónica necesario para obtener un tamaño de partícula entre 40-80 nm se encuentra entre 50 y 65 μm .

BIBLIOGRAFIA

- Bangham, A.D. *J. Mol. Biol.*, 13, 238, 1965.
- Schneider, M. *Liposomes as drug carriers: 10 years of research*. Elsevier Science publishers. Drug targeting, 1985.
- Sainz, M.C. *Industria Farmacéutica*, nov./dic. 105, 1988.
- Rahman, A. *Cancer Research*, 40, 1532, 1980.
- Forssen, E.A. *Cancer Research*, 43, 546, 1983.
- Sculier, J.P., Coune A., Meunier F., Brassinne C., Laduron C., Hollaert C., Collette N., Heymans C. and Klasterky J. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 24, 527, 1988.
- Habib M.J. *Int. J. of Pharmaceutics*, 44, 235, 1988.
- Gesztes A., Mezei M. *Tetracain. Anesth. Analg.*, 67, 1079, 1988.
- Prohías J.A. y Rosquete E. *Manual de prácticas de laboratorio de coloideoquímica*. Universidad de la Habana, Facultad de Farmacia, Cuba, 32, 1986.
- López Planes R. *Diseño factorial de experimentos*. ED Científico-Técnica, Cuba, 1984.
- Ostro, M.J. and Cullis P.R. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 46, 1576, 1989.
- Ostro, M.J. *Liposomes. Sci. Am.*, 257, 102, 1987.
- Gregoriadis, G. *Liposomes in Biological Systems*. Page Bros. LTD. Norwich, 1984.