

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS BIODEGRADABLES UTILIZANDO TÉCNICAS DE UV Y FLUORESCENCIA LÁSER CONFOCAL

Monica Roman¹, Jimmy Castillo², Vincent Picciteli², Kimberly Chinae¹, Guillermo Arribas¹,
Carlos Chinae^{1*}

1. Laboratorio de Polímero, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela. Correo electrónico: carlos.chinea@ciens.ucv.ve
2. Laboratorio de Espectroscopia Láser, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela

RESUMEN

Considerando que dentro del campo de la medicina, los polímeros biodegradables han encontrado una gran aplicación como agentes liberadores de fármacos, particularmente como sistemas de implantes subcutáneos de microcápsulas. En este trabajo se presenta la síntesis de homopolímeros ó copolímeros de glicolida y lactida, que han demostrado ser no tóxicos y biocompatibles y la preparación de microcápsulas conteniendo perclorato de rodamina 640. Se ha realizado el estudio, por microscopia electrónica de barrido, de la morfología y la estructura interna de las microcápsulas, observándose que eran lisas con una estructura interna tipo reservorio. Empleando microscopia confocal, fue posible seguir los cambios morfológicos ocurridos en las microcápsulas incubadas en un tampón fosfato de pH 7, y así simular, el comportamiento que tendrían en un medio fisiológico.

Palabras claves: Biodegradable, microscopio confocal, liberación controlada, polilactida.

ABSTRACT

Considering that within the field of medicine, polymers biodegradable have found a large implementation as drug delivery system, particularly as systems of subcutaneous implants for microcapsules. In this work is presented the synthesis of homopolymer or copolymer from glycolide and lactide, which have proved to be non-toxic, biocompatible, and preparation of microcapsules containing perchlorate of rhodamine 640. The study of the morphology and the internal structure of the microcapsules have been carried out by scanning electron microscopy, being observed that they were smooth with a structure internal type reservoir. Employing Confocal laser scanning microscopy was possible to follow the morphological changes occurring in the microcapsules incubated in a phosphate buffer pH 7, and thus simulating the behavior that would in an environment physiological.

Key words: Biodegradable, confocal laser scanning microscopy, drug release, polylactide.

1. INTRODUCCIÓN

El interés de la liberación de fármacos a través de portadores se ha incrementado considerablemente durante los últimos años. Las razones son obvias, si el portador tiene el potencial para dirigir el fármaco a su sitio de acción, un efecto farmacológico óptimo podría obtenerse y al mismo tiempo, los efectos adversos de los fármacos podrían disminuir [1]. Este deseo de dirigir los fármacos a los órganos blancos específicos es un viejo sueño discutido desde comienzo del siglo. La ciencia farmacológica actual encamina sus estudios hacia la búsqueda de un vehículo capaz de transportar el fármaco hasta su lugar de acción, a fin de

evitar, en lo posible, sus efectos adversos. De acuerdo con este criterio, se han desarrollado últimamente nuevos sistemas de administración de fármacos, como los liposomas, las nanopartículas y micropartículas, entre otros, siendo portadores coloidales particulares que se usan como sistemas de liberación de fármacos [2]. Los sistemas de transporte basado en materiales sólidos poliméricos en forma de nanopartículas y micropartículas presentan mayores ventajas que los liposomas en cuanto a estabilidad y reproducibilidad, en un intento de favorecer la penetración de los fármacos en zonas corporales de difícil acceso (barreras hísticas, neoplasias, etc.) [2]. Por un lado deben evitarse concentraciones excesivas que provoquen mayor frecuencia y gravedad de efectos colaterales y por otro, concentraciones insuficientes que pueden originar la pérdida del efecto terapéutico [2].

La importancia de los polímeros en la industria farmacéutica recientemente, se ha visto incrementada debido a que cumple dos funciones; como encapsulantes y como portadores. Los encapsulantes protegen y los portadores regulan la liberación del principio activo. El primer sistema para la liberación de fármacos usando polímeros de láctida/glicolida tuvo lugar en 1986 con el lanzamiento de decapeptil LP en Europa. Este fue el primer sistema de larga duración de micropartículas inyectable en el mercado. *Nihant et al.* en 1995, analizaron el efecto de la composición del copoliéster láctida/glicolida utilizado como cobertura, sobre la estabilidad de la primera y segunda emulsión y sobre la morfología final de las micropartículas obtenidas. Ellos observaron, que la primera emulsión, era más estable a medida que el copolímero empleado era menos hidrófobo, atribuyendo este efecto a que la interfase diclorometano/agua, ya que la tensión interfacial decrece cuando la hidrofobia del polímero también decrece. Estos autores también demostraron que el uso de soluciones de polímero en altas concentraciones, induce a la formación de esferas mas grandes, en contraste cuando las soluciones de agente dispersante fue alta, microesferas más pequeñas en diámetro son obtenidas. Es decir que el tamaño de las microesferas puede ser controlado con el uso de la concentración adecuada de polímeros y/o agente dispersante [3]. *Yi-Yang et als.* en 2001 realizaron un estudio morfológico, de distribución del fármaco y perfiles de liberación “*in vitro*” de microesferas de policaprolactona (PCL) y poli(láctida-co-glicolida) en una relación 65/35 conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) preparada por el método de doble emulsión y evaporación del disolvente, a fin de establecer una correlación entre estos factores, para emplearlos en dispositivos de liberación controlada en peces de zonas tropicales. Empleando un microscopio de barrido láser confocal (MBLC) ellos encontraron en las micrografías que la concentración de polivinilalcohol (PVA como emulsificante) en la fase externa acuosa influye

fuertemente en la distribución del fármaco dentro de las microesferas y en los perfiles de liberación, y que esta técnica provee una buena aproximación para explorar la estructura interna de las microesferas y distribución del fármaco [4]. Panyan et als. en 2003 investigaron el efecto del tamaño de partícula de nano y micropartículas de poli (D,L- Láctida-co-glicolida) (PLGA 50/50) en la degradación del polímero y liberación de albúmina sérica bovina (BSA), emplearon la técnica de doble emulsión agua/aceite/agua y evaporación del disolvente para preparar estas nano y micropartículas. Ellos encontraron que la degradación del polímero en nano y micropartículas de PLGA, con una rápida degradación durante los primeros 20-30 días seguido por una lenta fase de degradación [5].

2. PARTE EXPERIMENTAL

La síntesis de los polímeros y copolímeros de L-lactida, D,L-lactida y glicolida se realizó por el método de apertura de anillo. Se empleó dicloruro de estaño dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como catalizador, fijando esta concentración en 0,2% p/p de catalizador con respecto al peso total de la mezcla de monómeros para la síntesis; como iniciador se empleó dodecanol, la concentración de iniciador fue 0,05% p/p con respecto al peso total de la mezcla de monómeros [5].

La determinación de la composición de los copolímeros sintetizados se realizó por resonancia magnética nuclear (RMN): empleando un espectrómetro JEOL 270 MHz. Las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado en tubos de RMN de 5 mm a concentraciones de aproximadamente 1% en peso de polímero; los desplazamientos químicos fueron expresados en ppm.

La preparación de las microcápsulas se realizó a través de la técnica de doble emulsión agua/aceite/agua seguida por la evaporación del disolvente en el cual se encuentra disuelto el polímero. Se preparó una fase interna conteniendo una solución acuosa de rodamina + agar (agente emulsificante). Esta solución se mezcló con una fase orgánica inmiscible que contenía el polímero disuelto. La mezcla de ambas fases fue agitada durante cinco minutos, en un baño ultrasónico, para formar la emulsión agua/aceite [5].

La emulsión obtenida, se goteó sobre una solución acuosa de poli(alcohol vinílico) (PVA, un agente emulsificante), enfriada a 15°C mediante un criostato con recirculador de agua y bajo una rapidez de agitación de 750 rpm mediante un agitador mecánico durante 30 minutos para asegurar la formación de la emulsión agua/aceite/agua. Al finalizar este tiempo

se retiró el baño frío y se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente, cambiando la rapidez de agitación a 250 rpm por un tiempo de cuatro horas y media, tiempo durante el cual ocurre la evaporación del disolvente, y la formación de las microcápsulas. Las microcápsulas fueron filtradas, lavadas con agua abundante para eliminar los restos de PVA y agar, para luego ser secadas al vacío y pesadas [6] (véase la Figura 1).

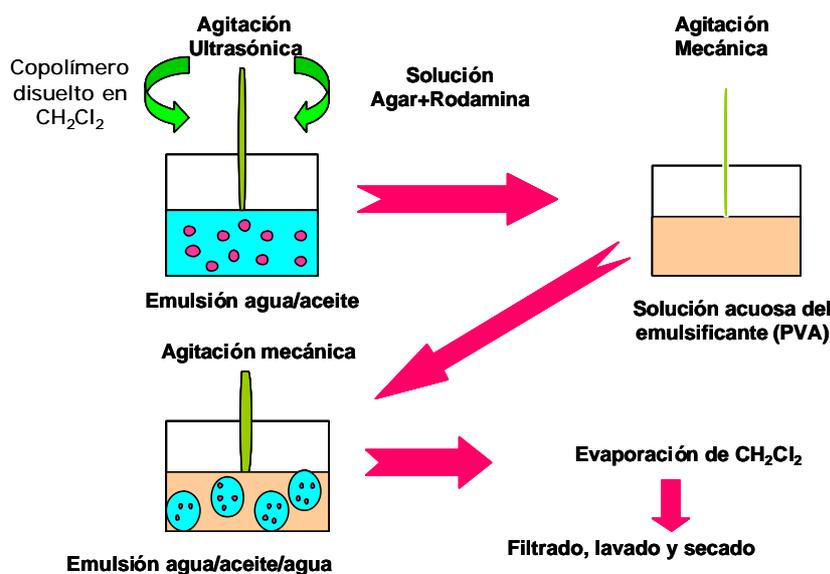


Figura 1. Proceso de microencapsulación empleando el método de doble emulsión y evaporación del disolvente.

2.1. Morfología de las microcápsulas. La morfología de las microcápsulas fue estudiada utilizando la microscopía electrónica de barrido (MEB). Las muestras fueron cubiertas iónicamente con una capa de oro (200 \AA) y observadas con un microscopio *Hitachi* modelo S-500 e irradiada con un haz de electrones de 20 kV.

El estudio de los cambios morfológicos ocurridos durante el proceso de liberación de la rodamina encapsulada fue realizado utilizando un microscopio óptico confocal. Para ello se tomaron microcápsulas de diferentes composiciones y fueron colocadas en una placa de vidrio y observadas al microscopio.

Las muestras fueron observadas en el microscopio utilizando un objetivo de 10x y para la adquisición de las imágenes una cámara CCD (*Sony*).

2.2. Eficiencia de encapsulación. La cantidad de principio activo encapsulado en las microcápsulas fue determinado a partir de la relación entre el principio activo encapsulado y

el teórico o en disposición de ser encapsulado, a partir de la expresión [7].

$$EE(\%) = \frac{\text{Cantidad de principio activo encapsulado}}{\text{Cantidad teórica de principio activo}} 100$$

La cantidad de rodamina encapsulada por unidad de peso de microcápsulas fue determinada por fluorescencia. Se colocaron 0,9323 g de microcápsulas en 9 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 1,3 M a una temperatura de 80°C para acelerar el proceso de liberación de rodamina así como completa degradación del polímero

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Rendimientos de polimerización. En la Tabla 1, se muestra la mezcla de alimentación de los monómeros empleados para la síntesis, lo que representaría el porcentaje molar teórico de los monómeros así como el porcentaje real de los monómeros dentro de cada copolímero. De igual forma se reportan los rendimientos obtenidos para cada uno de los polímeros.

Tabla 1. Rendimiento de producción de los polímeros sintetizados.

<i>% Molar del copolímero y el homopolímero Mezcla de alimentación</i>	<i>Gramos de partida</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
100 D,L-Lactida	9,92 g D,L-Lactida	74,4
L-Lactida/Glicolida (90/10)	0,90 L-Lactida /9,42 Glicolida (10,32 g)	75,2
D,L-Lactida/Glicolida (80/20)	2,02 D,L-láctida/8,02 Glicolida (10,04 g)	57,4

Se ha determinado que para los polímeros con mayor cantidad del monómero lactida se obtienen los mayores rendimientos.

3.2. Resonancia magnética nuclear (¹H RMN). La determinación de la composición molar de los copolímeros obtenidos, se realizó mediante el uso de la resonancia magnética nuclear de protones de cada uno de los materiales sintetizados. Se escogió la señal del metilo

de las unidades lactida, en los copolímeros de L-Lactida/Glicolida y D,L-Lactida y la señal de las unidades metileno de la glicolida, mediante las integrales de las señales de los protones del grupo metilo en la lactida y su relación con las integrales de los protones del metileno en la glicolida, fue posible determinar la composición de los monómeros en el copolímero. Como se puede observar de la Tabla 2, las composiciones reales para los copolímeros de L-Lactida/Glicolida y D,L-Lactida/Glicolida difieren de las cantidades colocadas en la mezcla de alimentación, como no existe preferencia alguna por uno o el otro monómero a estar en mayor cantidad en el copolímero, ambos tipos de unidades se ordenan al azar a lo largo de la cadena, esta diferencia entre la composiciones teórica y real de los copolímeros se deba a que una parte de la cantidad total de monómero pesada para cada composición correspondía a monómero hidrolizado.

Tabla 2. Porcentaje molar teórico y porcentaje molar real de los copolímeros, este último determinado por ^1H RMN.

<i>%Molar teórico de los copolímeros (Mezcla de alimentación)</i>	<i>%Molar exp* de los copolímeros</i>
L-Lactida-Glicolida 90/10	L-Lactida-Glicolida 68/32
D,L-Lactida-Glicolida 80/20	D,L-Lactida-Glicolida 70/30

*Determinado por ^1H RMN.

3.3. Rendimiento de producción de las microcápsulas preparadas con la metodología planteada. En la Tabla 3, se presentan los rendimientos obtenidos de microcápsulas preparadas bajo las condiciones de encapsulación con el método de la doble emulsión y evaporación de disolvente, empleando como matriz de cobertura, copolímeros que ya habían sido sintetizados y caracterizados en el laboratorio de polímeros.

Tabla 3. Rendimiento de producción para microcápsulas preparadas por la metodología descrita en la parte experimental correspondientes a diferentes composiciones D,L-Lactida/Glicolida.

<i>Composición de los copolímeros Glicolida/D,L-Lactida</i>	<i>Rendimiento de producción (%)</i>
37/63	23,2
8/92	13,4

Como los rendimientos obtenidos fueron muy bajos, bajo las condiciones de microencapsulación empleadas, y como interesa obtener en forma de microcápsulas la mayor parte de material de partida (polímero/principio activo) se realizaron cambios en la metodología de microencapsulación tal como mantener la rapidez de agitación constante durante todo el proceso a 750 rpm y eliminar el baño frío de la solución acuosa de PVA, los rendimientos de producción se incrementaron, tal como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Rendimiento de producción de las microcápsulas, manteniendo la temperatura de evaporación de disolvente así como la rapidez de agitación a 750 rpm durante todo el proceso.

<i>Composición de los copolímeros licolida/D,L-Lactida</i>	<i>Rendimiento de producción (%)</i>
8/92	69,7
37/63	56,5

Además de retirar el baño frío, mantener la rapidez de agitación fija en 750 rpm, se aumentaron las concentraciones de los materiales, mostradas en la Tabla 5.

Tabla 5. Cantidades empleadas para el proceso de microencapsulación cuando se eliminó el baño frío y se fijo la rapidez de agitación a 750 rpm.

<i>PVA</i>	<i>Polímero</i>	<i>Agar + Rodamina</i>
2 g en 100 mL de H ₂ O	1 g en 25 mL de CH ₂ Cl ₂	0,02 g Agar + 0,0015 g Rodamina en 10 mL de H ₂ O

En la Tabla 6 se presentan los rendimientos obtenidos, una vez que se retiró el baño frío, la rapidez de agitación se fijo a 750 rpm y que la concentración de los materiales fueron incrementadas.

Con los cambios introducidos, se logró mejorar el rendimiento de producción tal como se mostró en la Tabla 6; con lo cual se estableció entonces una nueva metodología de preparación de microcápsulas retirando el baño frío, manteniendo una rapidez de agitación de 750 rpm y aumentando la concentración tanto de agente emulsificante como de polímero. Con la optimización del método se prepararon microcápsulas con los polímeros sintetizados y los rendimientos obtenidos se reportan en las Tabla 7.

Tabla 6. Rendimiento de producción de las microcápsulas cuando se elimino el baño frío, se fijo la rapidez de agitación a 750 rpm y se aumento la concentración de polímero y agente emulsificante (PVA).

<i>Composición de los copolímeros Glicolida/D,L-Lactida</i>	<i>Rendimiento de producción (%)</i>
17/83	79,5
17/83	67,8

Tabla 7: Rendimientos de producción para microcápsulas de L-lactida/glicolida preparadas variando las condiciones en la metodología de encapsulación planteada.

<i>Composición de los copolímeros Glicolida/L-Lactida</i>	<i>Rendimiento de producción (%)</i>
10/90	56,9
10/90	66,3
10/90	65,6

3.4. Morfología de las microcápsulas vistas por MEB. El análisis superficial y morfológico interno de las microcápsulas preparadas por el método de doble emulsión y evaporación del disolvente independientemente de si se introducen o no cambios en la metodología experimental planteada, se observó por microscopia electrónica de barrido, que la microcápsulas presentan una superficie lisa y de apariencia suave (véase la Figura 2).

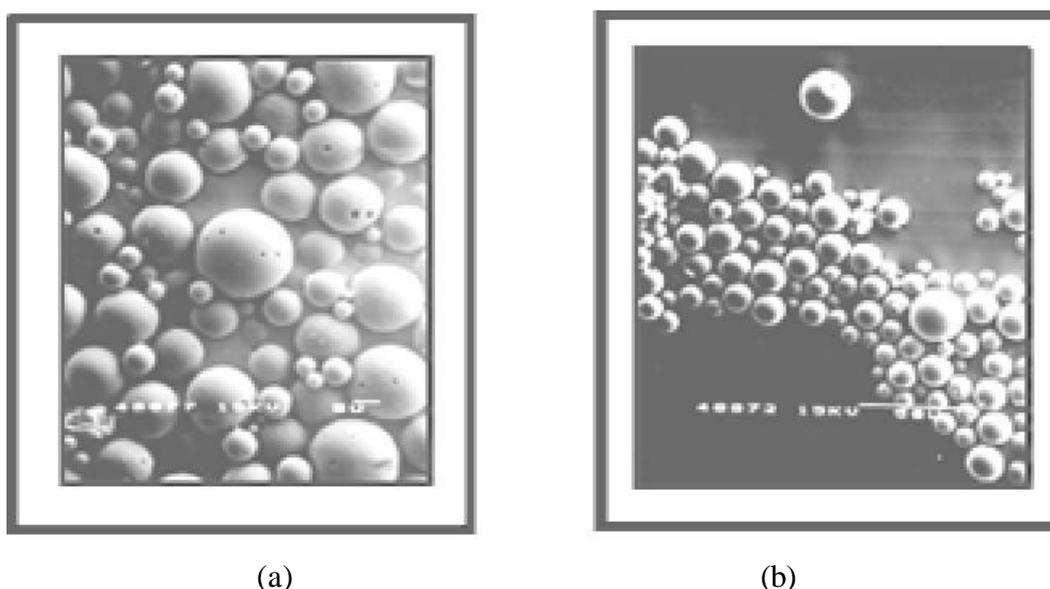


Figura 2. Microcápsulas vistas por MEB para la composición 83/17(a) y la (b) a la composición 63/37.

En la Figura 3, se muestran microcápsulas incluidas en una resina epóxica, la cual fue fracturada en nitrógeno líquido, el estudio de la muestra así preparada permitió observar la estructura interna de las mismas. Aunque las micrografías mostradas no son totalmente determinantes se puede decir, que la estructura interna para estas microcápsulas es de tipo reservorio o cáscara

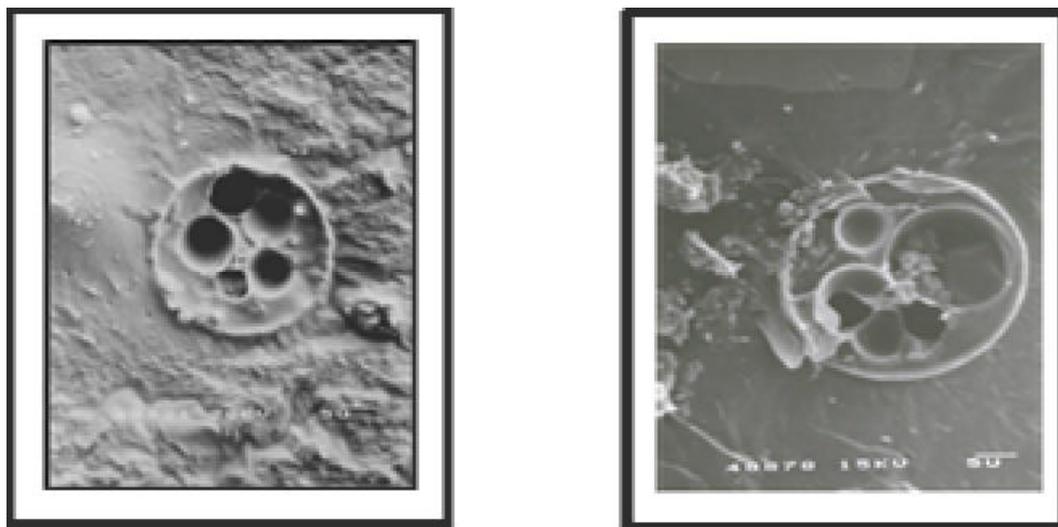
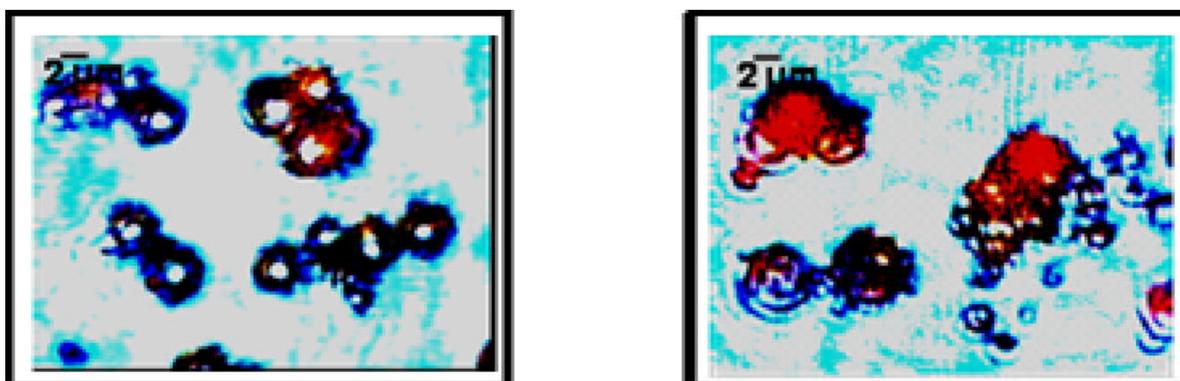


Figura 3. Microcápsulas vistas por MEB para la composición 92/8 y la composición 68/32.

3.5. Cambios morfológicos observados por MC durante el proceso de liberación de la rodamina encapsulada. Para conocer los cambios morfológicos ocurridos con las microcápsulas, cuando sufren degradación, se realizó un estudio morfológico preliminar, durante veinte minutos, colocando la muestra directamente sobre un portamuestra, el cual tenía adaptado una resistencia a 37°C, y observándose imágenes como las mostradas en la figura 4, las cuales fueron tomadas empleando un láser de 532 nm como fuente de excitación.



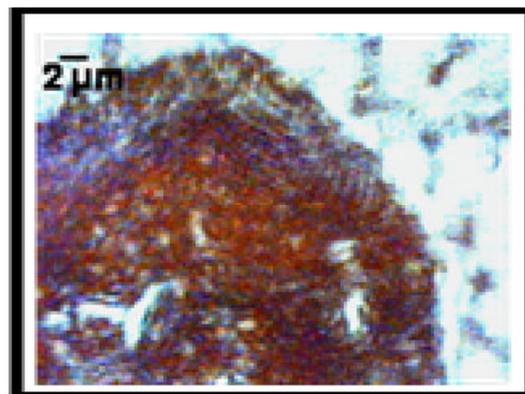
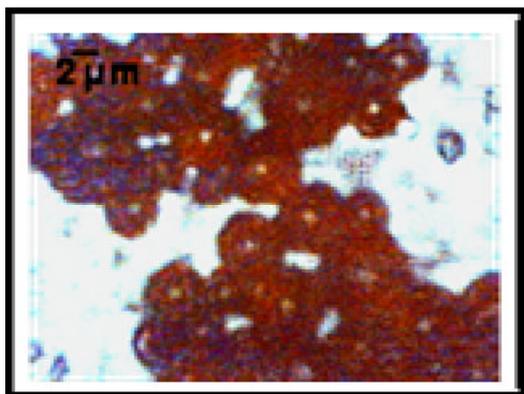


Figura 4. Seguimiento de la degradación de las microcápsulas, al ser calentadas con una resistencia a 37°C.

El estudio de los cambios morfológicos ocurridos durante el tiempo de incubación de las microcápsulas en un tampón fosfato a pH 7, fue seguido por microscopia confocal (empleando luz blanca) durante 12 días a una temperatura de 70°C, tiempo en el que ocurrió la degradación total del polímero que sirvió de material de recubrimiento para la rodamina encapsulada.

Durante los días de la degradación las microcápsulas fueron tomadas de la solución del tampón en la que se encontraban, los cambios observados en este tiempo se muestran en las siguientes micrografías (Figuras 5 a 10):

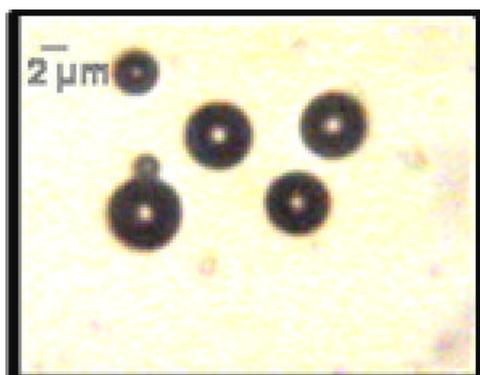


Figura 5. Micrografía tomada día 1

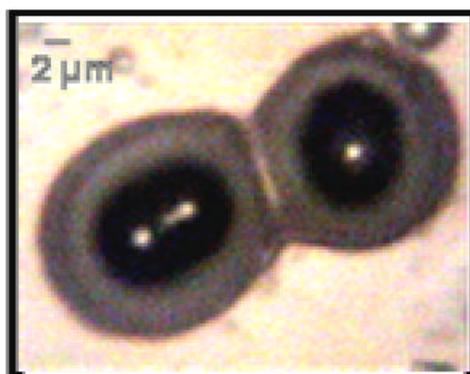


Figura 6. Coalescencia a los 2 y 3 días.

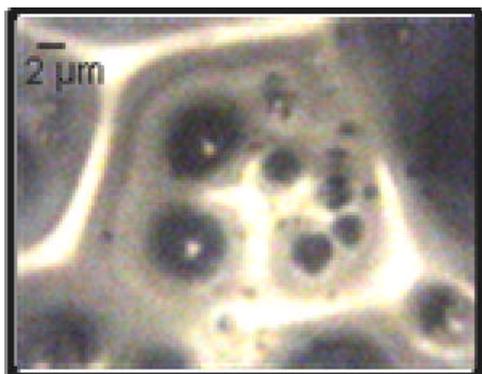


Figura 7. Fusión entre los días 4 y 5.



Figura 8. Masa amorfa entre los días 6 y 7

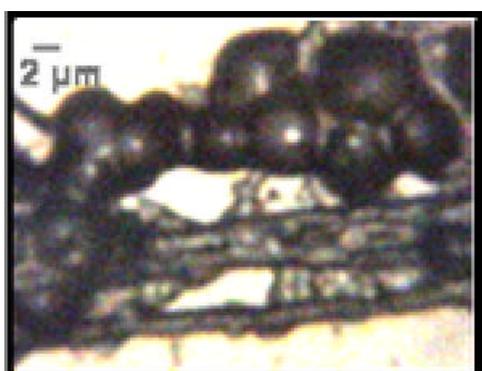


Figura 9. Cambio visto entre los días 8 y 9.

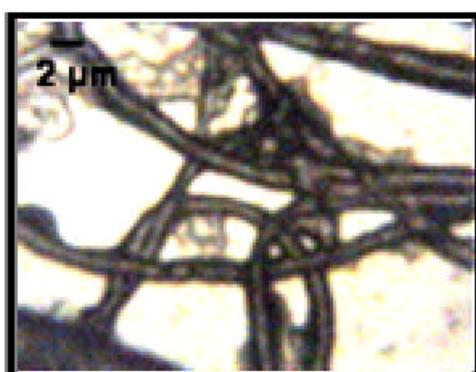


Figura 10. Fibras del polímero, días 10 y 11.

4. CONCLUSIONES

Introduciendo cambios en la metodología de microencapsulación fue posible optimizar algunos parámetros de las microcápsulas obtenidas, como el aumento en el rendimiento de producción y disminución de su tamaño con una distribución de tamaño mas estrecha.

El rendimiento de encapsulación obtenido fue alto, se logró recuperar en forma de microcápsulas la mayor cantidad del material de partida (polímero + rodamina).

La cantidad de principio activo por peso de microcápsulas o eficiencia de encapsulación obtenida fue 26,2%.

Cambios en las variables del proceso de microencapsulación no modificaron la morfología y la estructura interna de las microcápsulas obtenidas todas fueron lisas, suaves, regulares y de tipo reservorio.

Agradecimientos. Los autores de este trabajo agradecen al CDCH las ayudas proporcionadas (proyecto individual N° 030057502004).

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Román J. Polímeros biodegradables de interés en cirugía (II). Comportamiento biodegradativo y aplicaciones biomédicas. *Revista de plásticos modernos*, **414**, diciembre (1990)
- [2] Valero J, Egea MA, Alsina MA, García ML. “Sistemas poliméricos de administración de fármacos”, 93 (1985)
- [3] Nihant N, Schugens Ch, Grandfils C, Jerome R, Teyssie. “Polylactide microparticles prepared by double emulsion-evaporation II”, *J. Colloid & Interface Sci.*, **173**, 55 (1995)
- [4] Yan Yang Y, Shung Chung T, Ping Ng N. “Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation method”, *Biomaterials*, **22(3)**, 231 (2001)
- [5] Panyam J, Dali MM, Sahoo SK, Wenxue Ma, Chakravarthi SS, Amidon GL, Levy RJ, Labhasetwar V. “Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano-and microparticles”, *J. Controlled Release*, **92(1-2)**, 173 (2003)
- [6] Tortolero MV. “Empleo de polímeros biodegradables sintéticos como sistemas de liberación controlada de drogas en el tratamiento de infecciones óseas”. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias, Mención Química, Facultad de Ciencias, UCV (2002).
- [7] Vila J. “Microencapsulación de medicamentos. Tecnología Farmacéutica”, *Volumen I: Aspectos Fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*, capítulo 10.