

OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS DE UN MATERIAL POLIMÉRICO BIODEGRADABLE UTILIZABLES COMO PORTADORAS DE MEDICAMENTOS.

Rocío del Pilar Hernández Sierra^{*1}, Bernard Micheli¹, Luis Alfonso García Cerda², Jorge Romero García², Oliverio Santiago Rodríguez Fernández².

¹*Departamento de Química, ITESM. Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, N.L. México 64849.*
rocio@itesm.mx*

²*Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). Blvd. E. Reyna 140, Saltillo, Coahuila, México 25253*

El objetivo de esta investigación fue comprobar la factibilidad para la obtención de una nanopartícula portadora magnéticamente focalizable con una estructura de núcleo-coraza. Esta partícula debe tener un tamaño menor a 1 μm para facilitar su paso a través de los conductos sanguíneos y debe ser capaz de responder a un campo magnético de baja intensidad. Además debe retener tribenósido (medicamento) en el proceso de encapsulamiento y liberarlo lentamente. En este modelo, el núcleo se encuentra formado a partir de poli(β -bencil-L-aspartato) (PBLA) conteniendo magnetita y tribenósido en su interior. La coraza está formada por cadenas largas de poli(etilenglicol) (PEG-5000) las cuales hacen compatible a la nanopartícula con el plasma sanguíneo. Las partículas resultantes presentaron un tamaño de 300-500 nm, un comportamiento superparamagnético y una saturación magnética de 0.5 T. Presentaron una capacidad de retención de hasta 1000 ppm de tribenósido.

Introducción

Durante las últimas décadas, los investigadores se han enfocado a reducir la toxicidad de los medicamentos, de tal forma que puedan ser absorbidos por el organismo o tejido indicado sin causar daño en otro lugar. Al principio, los científicos crearon el concepto de liberación controlada^[1], sin embargo, se ha visto que este tipo de solución no es suficiente en algunos casos. Además es necesario desarrollar un método que permita fijar al medicamento en un lugar específico. En esta investigación se desarrollaron partículas magnéticas portadoras de medicamentos capaces de focalizar la acción terapéutica en el sitio requerido disminuyendo los efectos secundarios.

Las partículas deben ser capaces de evadir el reconocimiento de los macrófagos con el fin de incrementar la permanencia en la sangre^[2]. La estructura que cumple con este requisito es la de núcleo-capa. Esta clase de partícula es termodinámicamente estable debido a que disminuye la energía del sistema. Debido a que el tribenósido es un medicamento hidrofóbico, el núcleo debe ser hidrofóbico también. La capa hará compatible a la partícula con el plasma sanguíneo por lo que debe estar constituida por un material hidrofílico. Kwon et al^[3] investigaron el uso de PBLA-PEG como material potencial para esta estructura. El PBLA será capaz de retener al tribenósido y el PEG será capaz de prevenir la fagocitosis inmediata. Estudios previos^[4] muestran que una cadena de 20 unidades de PBLA puede absorber una molécula del tamaño de un medicamento.

Las plastroferritas son materiales hechos de ferritas cubiertas por un material polimérico. Dada su capacidad para responder a un campo magnético, es posible fijarlas por la acción de un imán y obtener un medio para focalizar la partícula portadora. En su estudio, Leach^[5] determinó que es necesario aplicar un campo magnético de 0.5T para saturar por completo a una partícula de magnetita cubierta por poli(óxido de etileno) a la temperatura normal del cuerpo (37°C). Comparando este valor con el utilizado en el utilizado en estudios de resonancia magnética nuclear de imágenes (0.5-5.0 T)^[6] este resulta ser un valor relativamente bajo. Además se ha demostrado que el uso de ferritas no incrementa la toxicidad de una partícula dentro del organismo^[7,8]. Es necesario que la partícula magnética tenga un comportamiento superparamagnético, tal que sea capaz de magnetizarse cuando el campo está presente y perder dicha magnetización en ausencia de él. Este comportamiento se cumple cuando la partícula magnética tiene un tamaño menor a 50

nm^[9]. El material magnético utilizado en esta investigación fue magnetita obtenida por el método de coprecipitación química. Este método asegura la obtención de magnetita del tamaño requerido^[10].

Se han desarrollado un gran número de técnicas para producir las partículas portadoras. La elección de la técnica depende de la naturaleza del polímero, el medicamento, el uso específico de la partícula y la duración de la terapia. Una de las metodologías que parece respetar todos los puntos anteriores es la formación de emulsión agua/aceite. En esta, el polímero y el medicamento son disueltos en un solvente volátil en el cual ambos son miscibles y posteriormente son mezclados con agua para formar la emulsión^[11]. El uso de un tensoactivo puede ayudar a obtener una emulsión más estable.

Uno de los problemas que surgen al utilizar partículas portadoras es la determinación de su tamaño. Este debe ser tan pequeño que pueda atravesar los capilares más pequeños evitando la obstrucción de los mismos. De acuerdo con R. Gref^[12] las partículas deberán tener un tamaño menor a 1 μm .

Sección experimental

Síntesis del PBLA-PEG

El monómero BLA-NCA fue sintetizado de acuerdo al método de Daly y Poché^[13]. El copolímero fue sintetizado de acuerdo al proceso de Kwon^[3] modificado para esta investigación. En breve, se utilizó DMF (*Aldrich*, 99.8%, *BP* 167°C) y cloroformo (*Aldrich* 99.8%, *BP* 60.5-61.5 °C) destilados como solventes para la polimerización. Ambos se recibieron en contenedores con malla molecular (*Aldrich*, 4Å pellets 1/8"). En un reactor se colocó 0.5000 g de BLA-NCA y se mezcló con 0.75 ml de DMF dentro de la cámara de guantes. A esta mezcla se agregó cloroformo hasta disolver por completo al BLA-NCA. Se agitó magnéticamente y se permitió que la temperatura se estabilizara 35°C. Se disolvió el mPEG-NH₂-5000 (*Nektar*, 114 unidades, funcionalidad de 98%) en cloroformo y se añadió al reactor. El sistema se dejó reaccionar durante 21.5 h. El copolímero fue purificado con éter etílico y metanol. Para la caracterización de este producto se utilizó ¹H NMR (JEOL JNM ECP-300 a 301 MHz) disolviendo la muestra en cloroformo (CDCl₃). El número de unidades se calculó mediante la comparación de los protones metilénicos de la cadena de PEG ($\delta = 3.7$ ppm) y los protones bencílicos de la cadena PBLA ($\delta = 5.01$ ppm).

Material magnético

El material magnético fue obtenido de los laboratorios del CIQA. Este fue preparado de acuerdo al proceso de Bacri^[10] y caracterizado por DRX (*Siemens D-500 CuK radiation at 25 mA and 35 KV*) and VSM (*Lake Shore 735*).

Partículas portadoras magnéticamente focalizables

Se dispersó 50 mg del polímero en 100 ml de agua destilada por medio de irradiación de ultrasonido (*Cole Parmer 8891*). Por otro lado se disolvió 10 mg de tribenósido (*Novartis*) en 10 ml de cloroformo. Se estabilizó 4.67 mg de magnetita en 10 ml de una solución de 10 mg AOT/ml (*Sigma*, $\geq 99.0\%$, *P.F.* 173-179°C). Se añadieron diferentes cantidades de una solución de tribenósido en cloroformo a la suspensión de magnetita. Se añadió esta mezcla a la dispersión del polímero en agua mientras se agitó a 640 rpm hasta formación de la emulsión. Se permitió que el cloroformo se evaporara lentamente manteniendo la muestra destapada toda la noche a temperatura ambiente. El tamaño de las partículas fue determinado por AFM (*Nanoscope IIIa. Instruments Digitalis. Veeco*) y SEM (*TOPCON SM-510*). La respuesta magnética fue determinada por VSM.

Determinación del medicamento encapsulado

Para determinar la cantidad de tribenosido encapsulado por las nanopartículas, se procedió de la siguiente forma. Se equilibró una cantidad conocida de tribenosido entre el agua y las nanopartículas y se separaron las dos fases por ultracentrifugación (*ADAMS Physicians Compact*) a 20,000 rpm y 20°C durante 1. El tribenosido disuelto en la fase acuosa se analizó por medio de HPLC con detector de luz UV. Se utilizó una columna de sílica (*Sorbaxz. Eclipse XDB-C8, size of particle 5µm, 4,6 x 150 mm*) como fase estacionaria, una mezcla de 75% acetonitrilo-25% agua como fase estacionaria y un detector de luz UV a 200 nm.

Liberación del medicamento

El análisis de liberación fue realizado a dispersiones de nanopartículas preparadas con diferentes concentraciones de medicamento en 5 mg de polímero y 10 ml de agua destilada. Se ultracentrifugaron y se separó el sobrenadante. El precipitado se dispersó nuevamente en 10 ml de agua destilada y se dejó equilibrar durante un determinado periodo de tiempo. Al cabo de este tiempo, se ultracentrifugó nuevamente y se analizó la fase acuosa mediante HPLC. Este mismo procedimiento se repitió para diferentes tiempos. Previo a esto se verificó que ni el tensoactivo ni el copolímero interfirieran en el análisis a 200 nm.

Resultados y Discusión

Síntesis del PBLA-PEG

Se sintetizó el material polimérico a partir de b-bencil-L-aspartato-N-carboxianhídrido (BLA-NCA) y mPEG-NH₂ por el proceso de Kwon^[3]. El proceso de polimerización se siguió mediante un análisis de espectroscopia de IR (desaparición de las bandas a 1862 y 1796 cm⁻¹ pertenecientes al anillo carboxílico. La figura 1 muestra el espectro IR para el copolímero de PEG-PBLA. El rendimiento de la reacción fue de 88.7% con 19 unidades de PBLA añadidas (RMN). La figura 2 muestra este espectro.

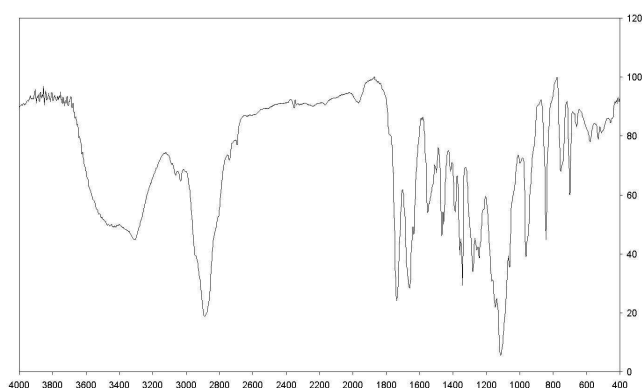


Figura 1. Espectro IR para el copolímero de PEG-PBLA

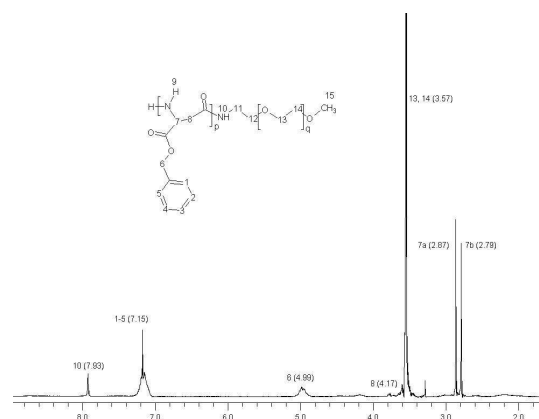


Figura 2. Espectro RMN para el copolímero de PEG-PBLA

Material magnético

Se utilizó magnetita como material magnético. Este fue obtenido por medio del método de Bacri^[10] y caracterizado por DRX (Figura 3). El patrón de difracción experimental muestra concordancia con el teórico reportado para la magnetita pura. De acuerdo a los datos de difracción el diámetro de partícula fue de 10 nm. La respuesta magnética fue determinada por VSM (Figura 4). El campo coercitivo fue de 33.64 Oe y la saturación magnética de 70.8 emu/g.

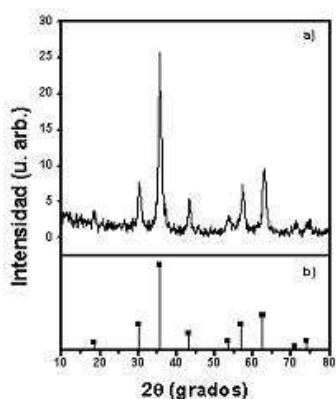


Figura 3. Espectro de DRX para la magnetita.

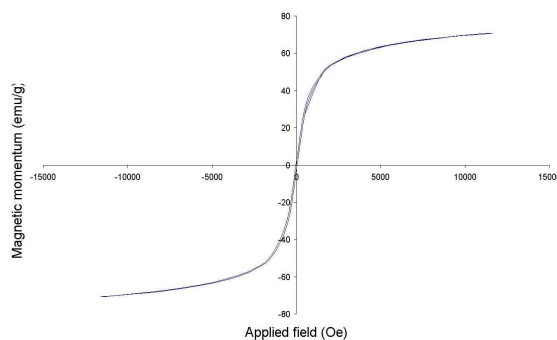


Figure 4. Comportamiento magnético de la magnetita pura por VSM.

Partículas portadoras magnéticamente focalizables

En el proceso de encapsulación se utilizó una emulsión agua-cloroformo. El diámetro de partícula fue de 300-500 nm determinados por SEM (Figura 5). El campo coercitivo medido por VSM fue de 33.6 Oe y la saturación magnética de 13 emu/g. La saturación magnética se llevó a cabo a un campo de 0.5 T (Figura 6). En esta gráfica es posible verificar el comportamiento superparamagnético de las nanopartículas.

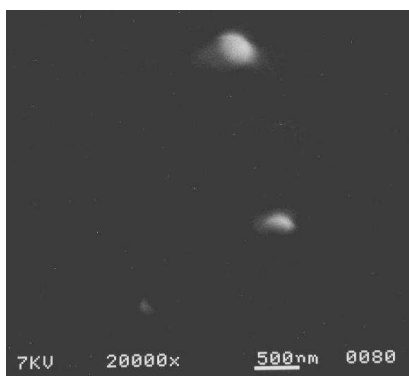


Figura 5. Partículas portadoras magnéticamente focalizables vistas por SEM

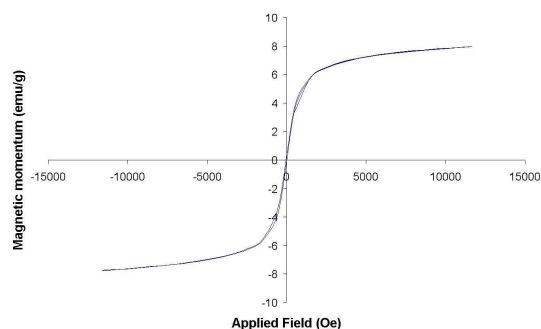


Figura 6. Comportamiento magnético de las partículas portadoras magnéticamente focalizables por VSM

Determinación del medicamento encapsulado

Se prepararon 10 muestras (con y sin magnetite) variando desde 0 hasta 1000 ppm de medicamento y se analizaron por HPLC (Figura 7). Los resultados obtenidos con y sin magnetita fueron prácticamente iguales, razón por la cual aparecen en una sola línea. Es posible observar que los puntos obtenidos se ajustan a una línea recta con un coeficiente de correlación, R , de 0.9452. Todos los análisis fueron realizados por triplicado en dos muestras de la misma concentración, es decir, cada punto corresponde a un promedio de 6 valores. La desviación estándar máxima obtenida fue del 16.6%. En todas las muestras se obtuvieron fases líquidas por debajo de la saturación. Esto implica que se logró aumentar considerablemente la compatibilidad del tribenósido en agua.

Liberación del medicamento

Se estudió la liberación del medicamento desde el núcleo de la partícula por medio de HPLC. El mecanismo de liberación parece ser la partición entre el núcleo hidrofóbico y el medio hidrofílico. Este mecanismo hace que la velocidad a la cual el tribenósido deja la partícula dependa fuertemente de la concentración inicial del mismo. La figura 8 muestra el comportamiento a diferentes concentraciones iniciales desde 15 hasta 200 ppm de tribenósido.

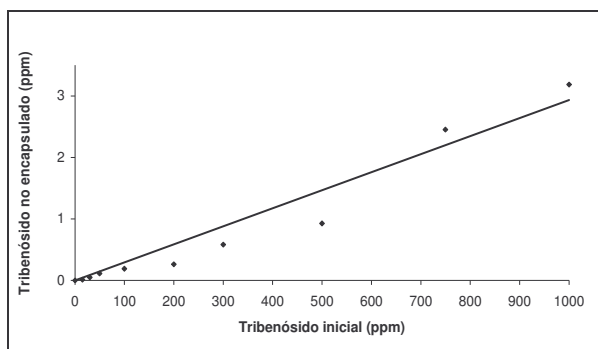


Figura 7. Medicamento no encapsulado vs. concentración inicial

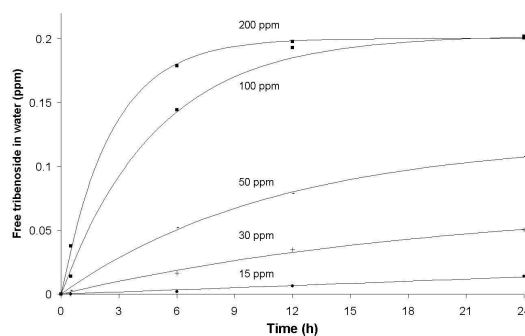


Figura 8. Liberación del medicamento por HPLC

Conclusiones

Se obtuvieron partículas magnéticas cubiertas por un material polimérico biodegradable conteniendo tribenósido en su interior. El tamaño de partícula fue de 300-500 nm. Las partículas son capaces de focalizarse a un campo de 0.5 T. El comportamiento magnético fue superparamagnético. Utilizando el copolímero fue posible incrementar la compatibilidad del tribenósido en agua. El mecanismo de liberación parece ser la partición entre las fases hidrofóbicas e hidrofílicas.

Referencias

1. Fung L.K.; Saltzman W. M. *Adv. Drug Del. Rev.* 1997, 2, 209
2. H. Ovadia, P. Y. Paterson, J.R. Hale. *Isr J Med Sci.* 1983, 19, 631.
3. G. Kwon. *Adv. Drug. Del. Rev.* 1996, 21, 107.
4. Schulz G.E., Schirmer R.H.. *Springer-Verlag.* 1979, New York
5. J. H. Leach. Thesis for the Virginia Polytechnic Institute and State University. (2003)
6. F. Herlach. *Physica B.* 2001, 500-504
7. Ibrahim, P. Couvreur, et al. *J. Pharm. Pharmacol.* 1983,35, 59-61
8. Lopera-Gómez, S.A., Plaza, R.C., A.V. Delgado.. *J. Coll. Inter. Sci.* 2001, 40-47
9. H. Stäblein. *Ferromagnetic Materials*, 1982, 3. 582-583. North-Holland Publishing Company.
10. J.C. Bacri, R. Perzynski, D. Salin, V. Cabuil, R. Massart.. *J. Magn. Magn. Mater.* 1990, 85, 27
11. Shuai X., Ai H., Nasongkla N., Kim S., Gao J. *J. Control Rel.*, 2004, 98, 415-426
12. R. Gref, et al. *Adv. Drug Del. Rev.* 1995,16, 215-233
13. W. H. Daly, D. Poché. *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 5859-5862