

Validación de un método de ultrafiltración centrífuga que permita evaluar la carga y la liberación de fármacos incorporados en nanocápsulas lipídicas

Gómez Lázaro Laura ^{*1}, Pérez López Alexandre¹, Martínez Herrera Karen¹, Martín Sabroso Cristina¹, Aparicio Blanco Juan¹, Torres Suárez Ana Isabel¹

¹Dpto. de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Universidad Complutense de Madrid.

*Correspondencia: lgomez14@ucm.es

1. Introducción

A diferencia de las formas farmacéuticas convencionales, para las nanomedicinas, debido a su tamaño coloidal, no existen protocolos estandarizados que permitan determinar la carga y la liberación del fármaco. Aunque existen diferentes métodos para su determinación (diálisis, centrifugación, métodos de detección in situ, etc.), su predictibilidad es dudosa debido a la dificultad de separar de manera eficaz el fármaco libre de los nanosistemas [1].

En este trabajo se valida un método de ultrafiltración centrífuga para lograr la eficiente separación entre fármaco y sistema coloidal, pudiendo así aplicarlo a la determinación de la carga y la liberación del fármaco de una forma reproducible. Como fármaco se escogió el ibuprofeno y como sistema coloidal nanocápsulas lipídicas (LNCs) con tamaño inferior a 100 nm.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Elaboración de las LNCs: Kolliphor HS15, Labrafac WL 1349, Lipoid[®] S75, agua MiliQ, NaCl e ibuprofeno. Filtros Amicon con una capacidad de retención de 10 KDa (15 mL) y 100 KDa (0,5 y 15 mL).

2.2. Métodos

2.2.1. Estudio de solubilidad del ibuprofeno

Cantidades crecientes de ibuprofeno se incorporaron a 10 mL de medio con dos pH diferentes (7,4 y 5,5). Se agitaron 10 minutos, filtraron y analizaron por HPLC a 214 nm.

2.2.2. Elaboración de LNCs

Se prepararon LNCs blancas y cargadas con ibuprofeno al 10 % (p/p) utilizando el método térmico de inversión de fases [2]. El pH de la fase acuosa se ajustó a 5,5

2.2.3. Validación del método de ultrafiltración centrífuga para la separación del fármaco disuelto de las LNCs

Se emplearon los filtros Amicon, y una fuerza de centrifugación de 11.200 g durante 10 minutos. Ensayos realizados:

- Cuantificación del paso de ibuprofeno en solución: Se utilizó una disolución de 1 mg/ml de ibuprofeno en PBS pH 7,4. El ibuprofeno presente en el filtrado se cuantificó por HPLC.
- Cuantificación del paso de LNCs blancas: Se utilizó una suspensión recién preparada de LNCs blancas. Se analizó el filtrado por espectrofotometría ($\lambda=386$ nm). Se definió una recta de calibrado para calcular el porcentaje de LNCs en una muestra, considerando el 100 % la suspensión de LNCs recién preparada.

c. Cuantificación del paso de fármaco libre en presencia de LNCs blancas: Se centrifugó una suspensión de LNCs recién preparada a la que se añadió ibuprofeno a una concentración de 1 mg/ml. El ibuprofeno presente en el filtrado se cuantificó por HPLC.

2.2.4. *Determinación de eficacia de encapsulación (E.E) de LNCs cargadas con ibuprofeno*

Se utilizó la suspensión de LNCs cargadas de ibuprofeno diluidas 1:16 en agua a pH 5,5. La E.E. se calculó como:

$$E.E = 100 - \left(\frac{mg \text{ filtrado}}{mg \text{ iniciales}} \right) * 100$$

2.2.5. *Determinación del ibuprofeno liberado a partir de las LNCs*

Se utilizó la suspensión de LNCs cargadas de ibuprofeno diluidas 1:16 en PBS a pH 7,4. El ibuprofeno liberado se calculó como:

$$\% \text{ liberado} = \left(\frac{mg \text{ filtrado}}{mg \text{ iniciales}} \right) * 100$$

3. Resultados y discusión

3.1. *Estudio de solubilidad del ibuprofeno*

La solubilidad del ibuprofeno en PBS fue pH-dependiente, con 4 mg/mL a pH 7,4 frente a 0,072 mg/mL a pH 5,5. En consecuencia, en la formulación de las LNCs con ibuprofeno se ajustó el pH de la fase acuosa a 5,5 a fin de favorecer su encapsulación en la fase oleosa, mientras que en la validación de los estudios de liberación se ajustó el pH del medio externo a 7,4 a fin de garantizar condiciones sink.

3.2. *Elaboración de LNCs*

La caracterización en términos de distribución de tamaño de partícula de las formulaciones elaboradas se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Tamaños medios e índices de polidispersión para las formulaciones de LNCs blancas y cargadas con ibuprofeno.

Formulación	Tamaño medio (nm)	PdI
LNCs blancas	88,0 ± 5,1	0,06 ± 0,04
LNCs cargadas con ibuprofeno	70,4 ± 3,9	0,07 ± 0,02

3.3. *Validación del método de ultrafiltración centrífuga para la separación del fármaco disuelto de las LNCs*

El porcentaje de fármaco en solución recuperado en el filtrado en ausencia de LNCs fue superior al 90 % con todos los filtros Amicon ensayados (Figura 1). Asimismo, el porcentaje de LNCs en el filtrado fue inferior al 4 % en todos los casos. Por último, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) en el porcentaje de ibuprofeno recuperado en el filtrado en presencia de LNCs blancas frente al obtenido en ausencia de las mismas (Figura 1). No se observaron diferencias en los valores de permeación de ibuprofeno y de LNCs para las dos capacidades de retención molecular ni para los diferentes volúmenes de muestra utilizadas en los filtros Amicon.

3.4. *Determinación de la E.E de LNCs cargadas con ibuprofeno*

Los valores de E.E fueron superiores al 90 % para los dos tamaños de retención molecular y los dos volúmenes de muestra utilizados (Figura 1).

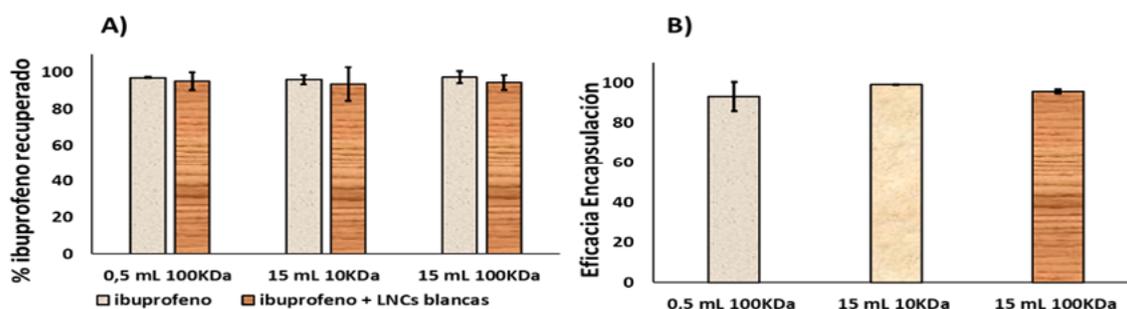


Figura 1. A) % de ibuprofeno en solución recuperado en ausencia y en presencia de LNCs blancas. B) Eficacia de encapsulación de LNCs cargadas al 10 % de ibuprofeno.

3.5. Determinación del ibuprofeno liberado a partir de las LNCs

En contacto con PBS a pH 7,4, las LNCs cedieron un $55,9 \pm 4,3$ % de fármaco, sin existir diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los distintos filtros utilizados.

4. Conclusiones

La filtración ultracentrífuga con filtros de capacidad de retención de 100 KDa son suficientes para conseguir una separación eficiente entre LNCs y fármaco en solución utilizando velocidades de centrifugación de 11.200 g durante 10 minutos. Asimismo, la técnica anterior es válida para filtros de pequeño volumen (0,5 mL) y de volumen intermedio (15 mL).

Referencias bibliográficas

1. Couvreur P. Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(1):21-3.
2. Aparicio-Blanco J, Sebastián V, Rodríguez-Amaro M, García-Díaz HC, Torres-Suárez AI. Size-tailored design

Este trabajo debe ser citado como:

Gómez Lázaro L, Pérez López A, Martínez Herrera K, Martín Sabroso C, Aparicio Blanco J, Torres Suárez AI. Validación de un método de ultrafiltración centrífuga que permita evaluar la carga y la liberación de fármacos incorporados en nanocápsulas lipídicas. *Rev Esp Cien Farm.* 2021;2(2):167-9.