

# DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTICULAS DE GANTREZ ASOCIADAS A CICLODEXTRINAS

*Maite Agüeros Bazo, Miguel Angel Campanero Martínez, Juan Manuel Irache Garreta*

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. 31080. Pamplona. España.*

## Introducción

Las ciclodextrinas (CDs) son un grupo de oligosacáridos cíclicos, obtenidos por degradación enzimática del almidón. Están compuestas por unidades de  $\alpha$ -1,4-glucopiranosas unidas entre sí, formando una estructura tipo cono truncado con una cavidad interna hidrofóbica. Estas pueden contener más de 15 unidades de glucopiranosas, aunque las más abundantes contienen 6 ( $\alpha$ -CD), 7 ( $\beta$ -CD) y 8 ( $\gamma$ -CD) unidades. En aplicaciones farmacéuticas, la  $\beta$ -CD y sus derivados son los más ampliamente utilizados, en particular la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD). Esta CD presenta una elevada solubilidad acuosa, una toxicidad inferior así como una cavidad más hidrofóbica comparada al compuesto de origen (1). Los complejos formados pueden proporcionar al huésped estabilidad, aumento de su solubilidad, biodisponibilidad y reducción de efectos adversos (2). Además, se ha descrito en la literatura la capacidad de aumentar la capacidad de carga de liposomas y micropartículas (3). Igualmente, son capaces de modificar el perfil de liberación del fármaco encapsulado (2,4).

En este contexto, se ha diseñado y preparado conjugados entre nanopartículas de Gantrez y diferentes ciclodextrinas para evaluar su capacidad como transportadores de fármacos por vía oral.

Gantrez AN es un copolímero entre metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) y se ha descrito su uso en la industria farmacéutica como espesante, estabilizante de soluciones acuosas,

componente de adhesivos dentales, parches transdérmicos y excipientes en comprimidos bucales (5).

Así, el objetivo general de este trabajo es combinar las propiedades de inclusión de las ciclodextrinas con la capacidad de las nanopartículas de Gantrez de modificar la liberación del fármaco y bioadhesión en zonas específicas del tracto gastrointestinal.

## Materiales

La  $\beta$ -CD fue obtenida de Sigma – Aldrich (Steinheim, Alemania) y la 2-hidroxipropil -  $\beta$  - ciclodextrina de RBI (Massachusetts, Estados Unidos). El copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) donado por ISP (Barcelona, España). La acetona y etanol fueron obtenidos de VWR Prolabo (Fantenay sous Bois, Francia). El aparato utilizado para el análisis HPLC fue en modelo 1100 de la serie LC de Agilent (Waldbronn, Alemania), acoplado a ELSD 2000 Alltech (Illinois, Estados Unidos). La columna, Zorbax Eclipse XDB – Phenyl, 2.1 mm x 150 mm, 5 $\mu$ m, de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). El Polietilenglicol 6000 (PEG 6000), utilizado como estándar interno, el acetonitrilo (grado HPLC) fueron obtenidos de Merk (Darmstadt, Alemania).

## Preparación de los conjugados NP – CD

La preparación de las nanopartículas de PVM/MA se ha realizado por el método de desolvatación. Dos procedimientos diferentes

han sido ensayados. El primero (llamado Método A) consiste en la desolvatación del polímero mediante la adición, a una solución orgánica del polímero, de un primer disolvente polar (miscible con la disolución del polímero) y posterior adición de un segundo líquido no-disolvente, en este caso una solución alcohólica. Para ello el copolímero se disuelve en un volumen concreto de acetona y se adiciona sobre ésta una solución hidroalcohólica. Las partículas se forman instantáneamente en el medio, bajo apariencia de suspensión lechosa. Estas nanopartículas se incuban durante diferentes tiempos con las CDs. El llamado Método B consiste en dispersar la CD, mediante sonicación, en un volumen concreto de acetona y añadir ésta sobre la solución de polímero disuelto previamente. Se incubaba la mezcla, bajo agitación constante, variando entre 0 y 60 minutos el tiempo de incubación. Finalmente se procede a la formación de las nanopartículas por el mismo procedimiento que el Método A. Posteriormente, se retiran los disolventes orgánicos (etanol y acetona) mediante evaporación bajo presión reducida, quedando las partículas en una suspensión acuosa estable. El paso siguiente consiste en la purificación de las nanopartículas por ultracentrifugación. Finalmente las nanopartículas purificadas son liofilizadas, utilizando una solución de sacarosa al 5% como crioprotector.

### Caracterización físico – química

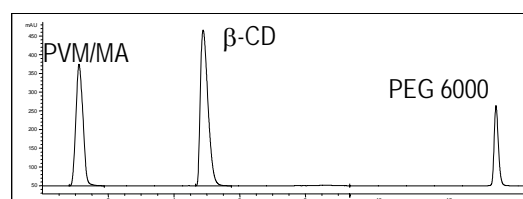
En este trabajo se han preparado diferentes formulaciones de nanopartículas, estudiándose la influencia de diferentes parámetros de formulación y la naturaleza de la ciclodextrina. La caracterización de las nanopartículas ha conllevado diversos estudios, que se describen a continuación. Dentro de los estudios físico – químicos se determinó el tamaño de partícula y la carga superficial de las nanopartículas, ésta última mediante la medida del potencial zeta. Ambos parámetros fueron obtenidos por espectroscopia de correlación fotónica, utilizando un Zetasizer nano Z-S (Malvern Instruments, Reino Unido). Igualmente, se determinó la eficacia de encapsulación. Para ello, la cuantificación de las CDs encapsuladas en las

diferentes formulaciones, se llevó a cabo desarrollando un novedoso método de HPLC acoplado a un detector tipo ELSD (evaporative light – scattering detection). La fase móvil utilizada, consistente en una mezcla de agua – acetonitrilo en gradiente y la columna seleccionada, ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl, proporcionan una buena resolución cromatográfica. Los sobrenadantes recogidos tras el proceso de purificación de las formulaciones, se diluyeron a 10 ml en agua purificada. Una alícuota del sobrenadante se analizó mediante esta técnica, utilizando PEG 6000 como patrón interno.

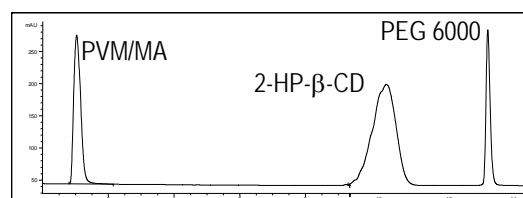
### Resultados y Discusión

#### 1. Optimización de la fabricación de conjugados NP – CD

Las figuras 1 y 2 muestran varios cromatogramas relativos al estudio de cuantificación de la cantidad de CD asociada a las nanopartículas de Gantrez. Como puede observarse los picos se resuelven bien y el método cromatográfico permite cuantificar las dos CDs y el copolímero utilizado como matriz de las nanopartículas.

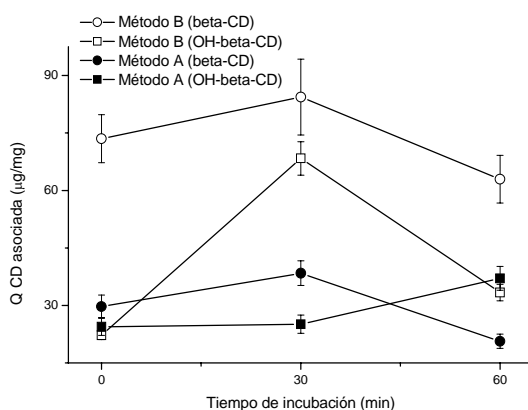


*Figura 1: Cromatograma correspondiente a NP asociadas a β-CD*



*Figura 2: Cromatograma correspondiente a NP asociadas a 2-HP-β-CD.*

Posteriormente se estudió la influencia de método de conjugación entre la CD y las nanopartículas y del tiempo de incubación en la eficacia de asociación. La figura 4 resume estos resultados.



**Figura 4:** Influencia de los distintos métodos de fabricación y del tiempo de incubación en la eficacia de asociación de las CDs a las nanopartículas.

En todos los casos, se observó un tiempo óptimo de incubación entre la CD y las nanopartículas (método A) o el polímero (método B). Este tiempo de incubación fue de 30 minutos.

Por otra parte, el método B (incubación entre CD y Gantrez previa a la formación de las nanopartículas) demostró ser más eficaz para conseguir mayores cantidades de CD asociada a las partículas. Por último es de destacar que la  $\beta$ -CD se asocia de forma más eficaz a las nanopartículas de Gantrez que su derivado hidroxilado (2-HP- $\beta$ -CD).

Tras este estudio de optimización, se preparan y caracterizan distintos lotes de estas partículas. La tabla 1 resume las características físico – químicas de estas formulaciones.

## 2. Caracterización físico – química de las formulaciones

La determinación de las características físico – químicas permitió comprobar cómo, independientemente de la CD utilizada, las

nanopartículas presentaban tamaños y cargas de superficie similares. Además esta carga es similar a la de las nanopartículas no tratadas con lo que se puede estimar que la mayor parte de la CD se encuentra localizada en el interior de las nanopartículas y no adsorbidas en superficie (Tabla 1).

**Tabla 1:** Características físico – químicas de las diferentes formulaciones (media  $\pm$  SD, n=12)

Formulación	Tamaño (nm)	Potencial Zeta (mV)	$Q_{CD}$ ( $\mu$ g/mg)
NP	179 $\pm$ 2	-48.1 $\pm$ 0.8	-
$\beta$ -CD – NP	144 $\pm$ 6	-51.1 $\pm$ 8.8	88.4 $\pm$ 9.9
OH-CD – NP	140 $\pm$ 7	-52.1 $\pm$ 3.7	68.4 $\pm$ 4.3

Por último, y con el fin de confirmar la presencia de las CDs asociadas a las nanopartículas, se realizó análisis elemental para las diferentes formulaciones (Tabla 2). De estos resultados se puede observar un aumento importante en la proporción de oxígeno en las formulaciones que llevan la ciclodextrina asociada, asociado a una disminución del porcentaje de carbono.

**Tabla 2:** Resultados de análisis elemental de las formulaciones vacías y asociadas a ciclodextrinas.

Formulación	C (%)	H (%)	O (%)	N (%)
NP	52.52	5.09	42.46	-0.07
$\beta$ -CD – NP	42.37	5.94	51.61	0.08
OH-CD – NP	41.27	5.92	52.84	-0.04

En conclusión, el método de fabricación B (incubación entre la ciclodextrina y el Gantrez previa a la formación de las nanopartículas), parece ser el más adecuado ya que consigue mayores eficacias de asociación de las

ciclodextrinas a las nanopartículas, especialmente para la  $\beta$  - CD. De acuerdo con los estudios de caracterización físico – química, parece ser que la ciclodextrina, principalmente, está localizada en el interior de las nanopartículas.

## Bibliografía

1. H. Boudad, P. Legrand, G. Lebas, M. Cheron, D. Duchêne and G. Ponchel, *Combined hydroxypropyl -  $\beta$  - cyclodextrin and poly (alkilcyanoacrylate) nanoparticles intended for oral administration of saquinavir*, *International Journal of Pharmaceutics* 218 (1-2) 113 (2001)
2. M. Singh, R. Sharma, U.C. Banerjee, *Biotechnological applications of cyclodextrins, Review*, *Biotechnology Advances* 20 341 (2002).
3. Uekama K, Hirayama F, Irie T. *Cyclodextrin Drug Carrier System*. *Hem. Rev.* 30:98 (5):2045 (1998).
4. F. Kihara, H. Arima, T. Tsutsumi, F. Hirayama, K. Uekama, *In vitro and In vivo gene transfer by an optimized  $\alpha$  - cyclodextrin conjugate with polyamidoamine dendrimer*, *Bioconjugate Chem.*, 14, 342 (2003).
5. P. Arbós, M. Wirth, M.A. Arangoa, F. Gabor, J.M. Irache, *Gantrez® AN as a new polymer for the preparation of ligand – nanoparticle conjugates*, *J. Control. Release* 83) 321 (2002).

## Agradecimientos

- Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra
- Consejería de Educación del Gobierno de Navarra
- Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto SAF2001-0690-C03-01)

### **Autor de contacto:**

Nombre y apellidos: Maite Agüeros Bazo

e-mail: magubaz@alumni.unav.es

Institución: Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra.

Dirección: Irunlarrea s.n

Ciudad: Pamplona

Tel.: 948425600 Ext 6313

Fax: 948425649