



## RESUMEN EXTENDIDO

### MICROPARTICULAS POLIMERICAS PARA LIBERACION CONTROLADA DE ANTIBIOTICOS HIDROFILICOS Satler, Florencia

*Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC). Universidad Nacional del Litoral (UNL). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Ruta Nacional 168, Km 472, 3000 Santa Fe, Argentina*

*Directora: Turino, Ludmila*

*Codirector: Karp, Federico*

Área: Ciencias de la Salud

Palabras claves: PLGA, biopolímeros, tilmicosina

## INTRODUCCIÓN

La liberación controlada de drogas utiliza una formulación con la capacidad de liberar el principio activo de forma sostenida en el tiempo, lográndose niveles plasmáticos o sitio-específicos dentro del rango terapéutico y durante el tiempo requerido por el tratamiento. Partículas basadas en polímeros biodegradables y con los principios activos encapsulados han demostrado que pueden cumplir perfectamente con la premisa. El PLGA (ácido poli(láctico-co-glicólico) es un poliéster de origen sintético, hidrofóbico y soluble en solventes orgánicos. Su uso en formulaciones farmacéuticas está aprobado por la FDA por ser biodegradable y biocompatible (Middleton y Tipton, 2000). Por otro lado, el atractivo de los polímeros de origen natural (o biopolímeros) radica principalmente en su amplia disponibilidad, su bajo costo, las posibilidades de modificación, su potencial degradabilidad y compatibilidad dado su origen. Entre estos, la pectina y el alginato poseen excelentes características de gelificación y biocompatibilidad (Chepeta y col., 2013). En el presente trabajo se analiza la encapsulación y liberación de tilmicosina desde micropartículas de PLGA, con y sin el agregado de biopolímeros. La tilmicosina es un antibiótico macrólido con una marcada solubilidad acuosa (>25 g/L, pH 7.4, 25° C) y utilizado ampliamente en el tratamiento de infecciones pulmonares en medicina veterinaria (Scoreaux y Shryock, 1999).

## OBJETIVOS

- Preparar y caracterizar micropartículas de PLGA conteniendo tilmicosina por el método doble emulsión (w1/o/w2) con evaporación de solvente.
- Estudiar el efecto del agregado de biopolímeros a la fase w1, en baja proporción, sobre el tamaño y morfología de las micropartículas, y sobre la encapsulación de tilmicosina.
- Evaluar in vitro los perfiles de liberación de tilmicosina a diferentes pH para estudiar el comportamiento de las matrices poliméricas.

Título del proyecto: Desarrollo de formulación novedosa para el tratamiento de enfermedades infecciosas en el ganado de producción cárnica y lechera

Instrumento: CAID  
Año convocatoria: 2016  
Organismo financiador: UNL  
Director/a: Turino, Ludmila

## METODOLOGÍA

Las micropartículas de PLGA se obtuvieron por el método doble emulsión (w1/o/w2) con evaporación del solvente. Para esto, 50 mg de antibiótico se disolvieron en 1 mL de agua (fase w1) y se emulsionaron con una solución de PLGA 15% p/v de diclorometano (fase o), utilizando un sonicador de punta. La w1/o obtenida fue emulsionada con PVA 2% p/v en una relación 1:6. Luego se evaporó el solvente orgánico en rotavapor, se centrifugaron las partículas y se tomó el sobrenadante para una evaluación indirecta de la eficiencia de atrapamiento (Karp y col., 2019). Finalmente, se recuperaron las micropartículas sintetizadas, se liofilizaron y se almacenaron a 4° C hasta estudios posteriores. Como alternativa, se incluyeron en la fase w1 los biopolímeros alginato y pectina en baja concentración. En la Tabla 1 se resumen las formulaciones ensayadas.

La tilmicosina fue cuantificada por cromatografía líquida de alta performance (equipo HPLC Shimadzu LC-10A). La distribución de tamaño promedio de las micropartículas se determinó mediante imágenes obtenidas con un microscopio óptico con cámara fotográfica incorporada (DM2500M, Leica) y un software informático de conteo y determinación de tamaños en fotografías (ImageJ, 1.40g, National Institute of Health, USA). En la Tabla 1 se muestra las eficiencias de encapsulación y el diámetro promedio de las micropartículas obtenidas para las formulaciones sin biopolímero (MP.H2O), con alginato (MP.ALG) y con pectina (MP.PEC). Como puede observarse, las tres formulaciones presentaron eficiencias superiores al 45%. La formulación con mayor eficiencia de encapsulación de tilmicosina fue la que contiene alginato en su composición. Esto podría deberse al aumento de la viscosidad y la consecuente mejora en la estabilidad lograda para la primer emulsión (Rosas y Pedraz, 2007; Zhai y col., 2015).

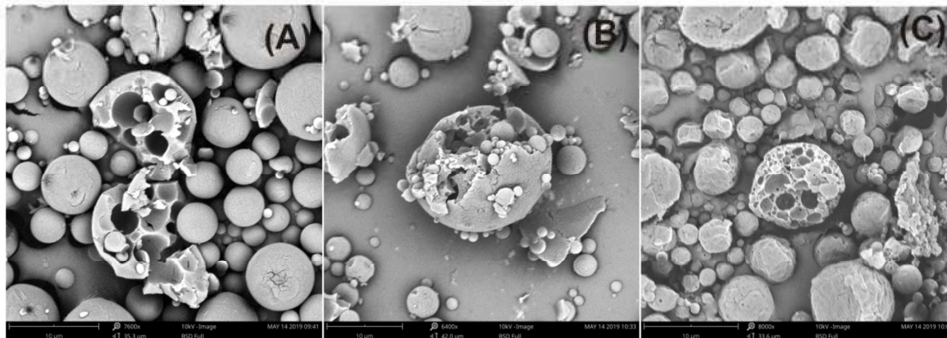
**Tabla 1:** Eficiencias de encapsulación y diámetro medio (desviación standard) de las partículas obtenidas para cada formulación

ID Formulación	Biopolímero (% p/v)	Eficiencia de encapsulación (%)	Diámetro medio (µm)
MP.ALG	0.5	80.61 (1.14)	5.31 (3.68)
MP.PEC	0.5	49.14 (5.24)	10.89 (5.13)
MP.H2O	0	68.98 (12.57)	2.60 (1.27)

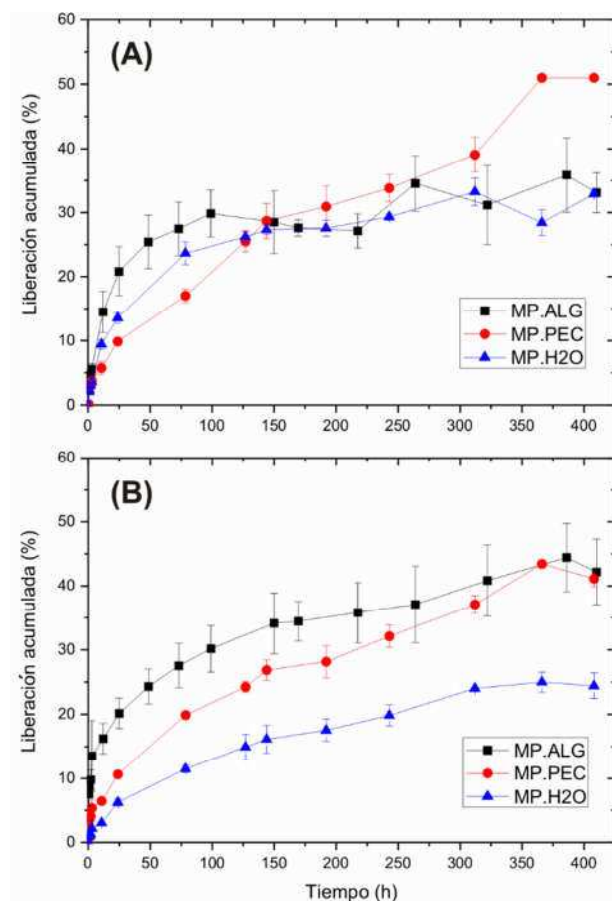
Por otro lado, podemos observar que el agregado de pectina aumenta el tamaño de las partículas de forma considerable. Esto podría deberse a la conformación tridimensional “egg-box” distorsionada que éste biopolímero presenta. Además, esta estructura también podría ocasionar una clara disminución en la eficiencia de atrapamiento, al favorecer una mayor difusión acuosa y la consecuente pérdida de principio activo durante la síntesis.

Las características morfológicas se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un equipo PhenomPROX (Thermo Fisher). Las microfotografías de SEM de la Figura 1 muestran una distribución de tamaños amplia, asociada al método de síntesis, con presencia de partículas esféricas. En particular, las MP.H2O (Fig. 1A) presentan una superficie

lisa y sin poros; un corte transversal muestra un interior con presencia de poros delimitados por zonas densas de polímero. En cambio, las MP.PEC (Fig. 1B), y más aún las MP.ALG (Fig. 1C), presentaron superficie más rugosa y poco porosa, con un interior notablemente más poroso y de paredes más finas que las micropartículas sin biopolímeros.



**Figura 1:** Microfotografías SEM de las formulaciones (A) MP.H2O, (B) MP.PEC y (C) MP.ALG. Escala = 10 µm.



**Figura 2:** Perfiles de liberación de tilmicosina en medio (A) Clark&Lubs pH=1.2 y (B) TRIS pH 7.4, para las diferentes formulaciones de micropartículas.

Los perfiles de liberación in vitro del antibiótico se realizaron depositando una masa de micropartículas (equivalente a 1 mg de tilmicosina) en 20 mL de medio Clark&Lubs pH=1.2 (estimula la degradación del PLGA) y en 20 mL de medio Tris pH=7.4 (simula el pH parenteral), evaluados de forma independiente, en viales perfectamente cerrados. Los recipientes se mantuvieron a 37°C y en agitación orbital (100 rpm). Se tomaron muestras con reposición de medio a distintos tiempos: 0.5, 1, 2, 3, 12, 24 h, y luego periódicamente hasta cumplidos 17 días de liberación. Se cuantificó la masa acumulada de antibiótico liberado por HPLC. Los perfiles de liberación realizados se observan en la Figura 2. Para el caso de las MP.H2O, puede observarse una liberación acelerada en el caso del medio ácido, 30% liberado a las 100 h (Fig. 2.A), cuando se lo compara con el medio neutro, 12% liberado a las 100 h (Fig. 2.B). Esto puede deberse a una mayor degradación de la matriz polimérica catalizada por el medio ácido circundante. El PLGA sufre una aumentada degradación hidrolítica en presencia de grupos ácidos y bajos valores de pH (Makadia y Siegel, 2011). Para el caso de las micropartículas con

biopolímeros puede apreciarse un comportamiento similar con respecto a MP.H<sub>2</sub>O a partir de las 150 h (Fig. 2.A). Este resultado podría evidenciar que la preponderancia del fenómeno de degradación matricial debido al pH ácido circundante es el responsable de la liberación de la droga. Más aún, que la velocidad de degradación del polímero no se vería afectada por la presencia de los biopolímeros en la proporción estudiada. Sin embargo, en el caso del medio con pH 7.4 (Fig. 2.B), la presencia de los biopolímeros aumentaría la velocidad de liberación. Descartando un efecto sobre la degradación del PLGA, ese aumento puede explicarse por la mayor porosidad apreciable en el orden MP.ALG > MP.PEC > MP.H<sub>2</sub>O (Fig. 1). Un mayor número de poros permitiría un mayor contacto del principio activo con el medio acuoso y una consecuente difusión aumentada.

## CONCLUSIONES

Se lograron sintetizar micropartículas de PLGA con el antibiótico tilmicosina encapsulado, utilizando una técnica de doble emulsión (w1/o/w2) y con biopolímeros (alginato y pectina) como posibles estabilizantes de la fase w1. Las micropartículas resultaron de forma esférica y con porosidades variables. La presencia de alginato permitió obtener valores de eficiencia de encapsulación superiores a las formulaciones con pectina y sin biopolímero. Al evaluar las liberaciones del antibiótico in vitro en medio ácido, se observó un comportamiento similar para todas las formulaciones, evidenciándose un posible control de liberación de tilmicosina por degradación hidrolítica del PLGA. Para el caso del medio a pH 7.4, se pudieron observar liberaciones aceleradas cuando se utilizaron los biopolímeros, lo que podría asociarse a la mayor porosidad observada en dichas formulaciones. Los sistemas estudiados representan una oportunidad para el diseño de tratamientos con tilmicosina en diferentes condiciones de pH.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Cheptea, C., Holban, M., Peptu, C., Lionte, C., Șunel, V., Popa M., Desbrieres, J.**, 2013. Synthesis and antimicrobial activity of new amidic derivatives of 5-nitroindazol-1-yl acetic acid encapsulated into alginate/pectin particles. *Cellulose Chemistry and Technology*, 47, 23-29.
- Karp, F., Busatto, C., Turino, L., Luna, J., Estenoz D.**, 2019. PLGA nano- and microparticles for the controlled release of florfenicol: Experimental and theoretical study. *Journal of Applied Polymer Science* 136, 47248-47256.
- Makadia, H.K., Siegel, S.J.**, 2011. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)*, 3, 1377-1397.
- Middleton, J.C., Tipton, A.J.**, 2000. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, 21, 2335-2346.
- Rosas, J.E., Pedraz, J.L.**, 2007. Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 36, 134-153.
- Scoreaux, B., Shryock, T.R.**, 1999. Intracellular accumulation, subcellular distribution, and efflux of tilmicosin in bovine mammary, blood, and lung cells. *Journal of Dairy Science*, 82, 1202-1212.
- Zhai, P., Chen, X.B., Schreyer, D.J.**, 2015. PLGA/alginate composite microspheres for hydrophilic protein delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 56, 251-259.