

# Dextrano: polímero transportador para la liberación de fármacos intraoculares

## Dextran: carrier polymer for intraocular drug delivery

ISABEL C ANDUEZA<sup>\*1</sup>; GUNTHER HOCHHAUS<sup>2</sup>

### RESUMEN

La administración de los fármacos bajo la forma de colirio, afecta su farmacocinética, debido a las barreras protectoras del segmento anterior del ojo, ellas impiden alcanzar concentraciones efectivas en el segmento posterior. La vía más adecuada para tratar las inflamaciones intraoculares la constituye la inyección intravítrea, sin embargo, su uso frecuente puede ocasionar riesgos que afectan la visión. Es por ello, que en este trabajo se diseñó un sistema de liberación para el hemisuccinato de metilprednisolona empleando dextrano de diferentes pesos moleculares como polímero transportador. Se evaluó el contenido del fármaco en la matriz polimérica mediante hidrólisis básica y su liberación *in vitro* en función del tiempo. De igual modo, se investigó su liberación una vez encapsulado en nanopartículas de quitosano. El fármaco fue capaz de unirse covalentemente a los dextrans de 10 y 70 kDa observándose una mayor concentración en el de menor peso molecular, muy probablemente debido a la estructura menos voluminosa y más ramificada del polímero, que favoreció la interacción efectiva de los grupos hidroxilos del dextrano 10 kDa, con el grupo carboxilo del fármaco. Asimismo, los estudios de liberación durante ocho días, estuvieron cercanos al 35% de metilprednisolona, observándose una liberación más lenta en el compuesto sintetizado con dextrano de menor peso molecular. Al encapsular éste último, se observó que su liberación disminuyó alrededor de un 50%. Tomando en consideración estos hallazgos, se concluye que se podría continuar los estudios *in vivo*, empleando el hemisuccinato de metilprednisolona-dextrano 10 kDa y quitosano como posible sistema de liberación prolongada.

**Palabras clave:** Oftálmico; sistema de liberación; dextrano.

### ABSTRACT

Administering drugs by eye drops modifies its pharmacokinetic's. The absorption is limited due the protective barriers that prevent reaching intraocular therapeutic concentrations. The most appropriate route of intraocular administration for inflammatory treatment is the intravitreal injection; however, its frequent application may cause ocular damage to the patient and, affect the vision. The objective of this work was to design an intraocular delivery system, using Dextran with different molecular weights as drug carrier and, methylprednisolone hemisuccinate as model drug. We evaluated the drug content in the polymeric matrix, applying a basic hydrolysis as well as their *in vitro* release under isotonic and physiological pH conditions. As well as, we investigated the drug release, once encapsulated in Chitosan nanoparticles. The drug was able to bind covalently to Dextrans 10 and 70 kDa. The polymer with lower molecular weight showed higher drug concentration, maybe because of its structure, which is less bulky and with more ramifications sections, so there may be better interaction between the Dextran 10 kDa's hydroxyl group and the drug's carboxyl group. Also, *in vitro* release studies during eight days were close to 35% of methylprednisolone. However, the lower molecular weight compound showed slower release. By encapsulating dextran 10 kDa-drug, the drug release decrease around 50%. Therefore, these findings could help to continue with *in vivo* studies, using Dextran 10 kDa-methylprednisolone hemisuccinate and Chitosan as extended-release system.

**Key words:** Ophthalmic; delivery system; dextran.

<sup>1</sup> Facultad de Farmacia, Unidad de Formulación, Caracterización y Optimización. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

<sup>2</sup> College of Pharmacy, Department of Pharmaceutics. University of Florida, Gainesville-Fl., Estados Unidos.

\* E-mail: isabel.andueza@ucv.ve

## Introducción

Las inyecciones intravítreas constituyen un riesgo al paciente, que aumenta con la frecuencia del tratamiento, pudiendo afectar la visión. En este sentido, se han hecho esfuerzos en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos que sean más efectivos en lugares específicos del organismo, es decir, que su acción terapéutica sea dirigida exclusivamente a un órgano blanco y que a su vez, el compuesto activo actúe por un período deseado en el sitio de acción sin causar efectos indeseados en otras partes del organismo. De forma general, se podría entender como sistema de liberación de fármacos, cualquier módulo de administración capaz de aportar un beneficio biofarmacéutico, farmacocinético o terapéutico. Estos beneficios se relacionan con un incremento de la biodisponibilidad del principio activo, una prolongación del tiempo de permanencia y por ende, la frecuencia de administración.

En la búsqueda de técnicas efectivas y eficientes, nuevos estudios se han inclinado hacia el empleo de macromoléculas para el desarrollo de sistemas de liberación. Macromoléculas como anticuerpos, lipoproteínas, proteínas, polipéptidos, polisacáridos y polímeros, tanto naturales como sintéticos, han ofrecido potenciales ventajas como transportadores de compuestos con actividad terapéutica. Su selección toma en consideración factores como vía de administración, solubilidad en agua, estabilidad química, permeabilidad celular y perfil de liberación deseado. La hidrosolubilidad de estos sistemas ofrece varias ventajas: estabiliza el agente terapéutico, mejora la solubilidad en agua de compuestos activos lipofílicos cuando éstos se encuentran unidos a una macromolécula hidrofílica, incrementa el tiempo de vida *in vivo* del agente terapéutico, prolonga la duración de la acción y reduce los efectos colaterales, entre otras (Strickley y Oliyai, 2007). Won y Chu (1998), elaboraron un profármaco de estrógeno modificado-dextrano, mediante enlace éster lábil entre el dextrano (Dex) y el estrógeno. Los estudios de liberación *in vitro* demostraron que la solubilidad en agua favoreció la completa hidrólisis de la hormona, siguiendo una cinética de orden cero. Por otra parte, los profármacos de aplicación oftálmica en su mayoría son ésteres derivados del fármaco activo. La esterificación es posible en aquellas moléculas que presentan grupos hidroxilo libre y/o carboxilo (Strickley y Oliyai, 2007). Se ha demostrado que a nivel del segmento posterior del ojo (retina, coroides, esclera, y humor vítreo), se encuentra una gran variedad de enzimas metabólicamente activas tales como esterases, peptidasas y lisozimas que están involucradas en la desintoxicación de los tejidos, a fin de mantener la

homeostasis ocular y que podrían ser aprovechadas en el metabolismo de los fármacos (Duvvuri y col., 2004). Esto nos ha llevado a pensar a muchos investigadores, en el desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de sistemas de transporte de fármacos para uso oftálmico, que no solo incluya la optimización de sus propiedades fisicoquímicas, sino que también involucre la capacidad de regular la distribución y depuración del fármaco después de su administración; logre alcanzar el sitio específico de acción a una velocidad y régimen de dosificación terapéuticamente controlado y óptimo; libere el compuesto activo mediante reacciones enzimáticas y/o químicas *in vivo*; proteja y estabilice al fármaco en el ambiente biológico durante todo su recorrido hasta llegar al lugar estimado y por último pero no menos importante, que reduzca los efectos adversos y tóxicos (Bodor y Buchwald, 2005; Paolicelli y col., 2009).

Es por ello, que esta investigación se enfocó en desarrollar sistemas de liberación intravítreo, biodegradable, hidrosoluble y compatible a nivel ocular, que empleó como compuesto activo el 21-hemisuccinato de metilprednisolona (MPS) y como macromoléculas, dextranos de diferentes pesos moleculares, para así formar 21-hemisuccinato de metilprednisolona-dextrano (MPS-Dex). De igual modo, se evaluó la liberación *in vitro* del MPS-Dex 10 kDa, una vez que éste fue encapsulado en nanopartículas (NPs) de quitosano (Qs).

## Materiales y métodos

### REACTIVOS Y MATERIALES

La Metilprednisolona (MP) y el MPS fueron adquiridos de Steraloids Inc, USA. Tripolifosfato sódico (TPP), acetato de sodio; ácido acético glacial, solución amortiguadora de fosfato pH = 7,4, Trietilamina (TEA), acetonitrilo y metanol grado HPLC, fueron obtenidos de Fisher Scientific, USA. Dextrano (Dex) con pesos moleculares promedios de 72,627 kDa y 10,200 kDa; 1,1' Carbonildiimidazol (CDI); Dimetilsulfóxido anhidro (DMSO); 2 propanol anhidro; éter metil terbutílico anhidro; hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y el Quitosano (Qs) (50-190 kDa), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

### SÍNTESIS DE LOS MPS-DEX

Se adaptaron los métodos previamente publicados por McLeod y col. (1993) y Varshosaz y col. (2009). Se emplearon Dex de dos pesos moleculares: 70 kDa y 10 kDa. A continuación una breve descripción de la metodología.

**Condiciones:** Atmósfera de nitrógeno, protección de la luz y reactivos anhidros.

**Procedimiento general:** Se disolvieron 0,1062 mmol de MPS y 0,4934 mmol de CDI en 3 mL de DMSO y se mantuvo en agitación constante a una temperatura ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Luego se incorporó una solución que contenía 0,05 mmol de Dex 70 o 10 kDa en DMSO y 1 mL de TEA. Se continuó agitando por 48 horas a temperatura ambiente controlada. Los productos MPS-Dex 70 kDa y MPS-Dex 10 kDa fueron precipitados y lavados con mezclas de 2-propanol y éter metil terbutílico. Los precipitados fueron separados del sobrenadante por centrifugación con posterior decantación del líquido. Finalmente, los productos obtenidos se liofilizaron y se conservaron en tubos de poliestireno a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 1).

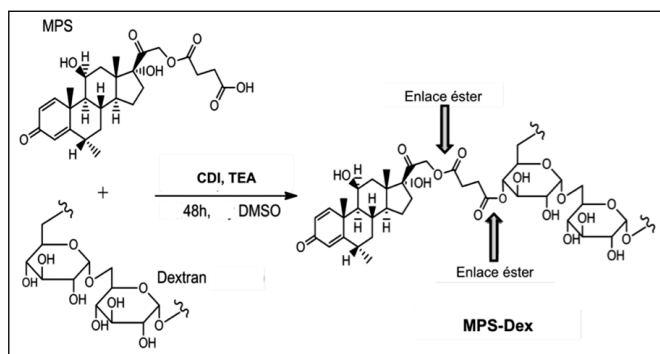


Figura 1. Síntesis del MPS-Dex.

#### DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MPS

La cuantificación del contenido del fármaco se logró mediante una hidrólisis básica donde se liberó el compuesto terapéuticamente activo, MP (Varshosaz y col., 2009). Se disolvieron 5 mg de cada uno de los MPS-Dex en 3 mL de metanol y se hicieron reaccionar con NaOH 0,02N por 20 minutos (Figura 2). La reacción se detuvo con el añadido de solución de HCl. El contenido de MP resultante de la hidrólisis, se determinó aplicando el método de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución, de su siglas en inglés) con fase reversa, empleando una columna C18 y fase móvil de 60% de metanol y 40% de solución amortiguadora de acetato de sodio/ácido acético pH = 5,5 (Andueza, 2012). Los resultados obtenidos se expresaron en concentración de mg MPS/100 mg de MPS-Dex.

#### ELABORACIÓN DE NPS DE QS POR EL MÉTODO DE GELIFICACIÓN IÓNICA (NPS<sub>MPS-DEX-QS</sub>)

Las NPS<sub>MPS-DEX-QS</sub> se formaron espontáneamente por neutralización de cargas, al interactuar a temperatura ambiente y en medio ácido, el Qs cargado positivamente con el TPP (contra-anión), en una proporción de 3,6:1 p/p respectivamente. Los parámetros de pH, velocidad de añadido de la solución de TPP y tiempo de reacción fueron cuidadosamente controlados. La síntesis de las NPs se realizó en presencia de

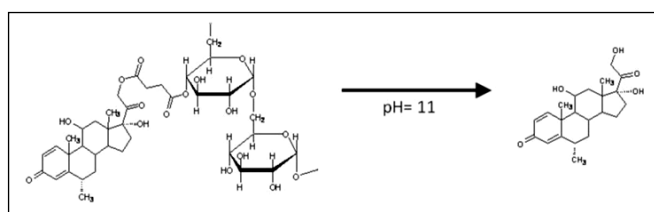


Figura 2. Hidrólisis básica del MPS-Dex en el grupo éster en posición 21.

MPS-Dex 10 kDa como polímero terapéutico. Las NPS<sub>MPS-DEX-QS</sub> fueron purificadas por diálisis y posteriormente liofilizadas (Andueza y Hochhaus, 2013).

El contenido de MP en las NPs liofilizadas se obtuvo mediante la extracción con solución amortiguadora acetato de sodio/ácido acético pH= 5,5. Posteriormente se ejecutó una hidrólisis básica y se cuantificó por el método de HPLC ya descrito (Andueza y Hochhaus, 2013).

#### LIBERACIÓN *IN VITRO* DEL MPS DURANTE LA INCUBACIÓN CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA ISOTÓNICA DE FOSFATO

Se incubaron muestras de 5 mg de MPS-Dex en 8 mL de solución amortiguadora isotónica de fosfato pH = 7,2 a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con agitación constante a 40 revoluciones por minuto. Se tomaron muestras de 500  $\mu\text{L}$  y se diluyeron con 500  $\mu\text{L}$  de fase móvil, a diferentes tiempos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 horas y luego 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 días (Dann, 1999). Estas muestras fueron analizadas empleando el método basado en la técnica de HPLC referida previamente.

Para las NPS<sub>MPS-DEX-QS</sub> se aplicó este mismo procedimiento, pero incubando 10 mg de las NPs en 5 mL de la solución amortiguadora, durante 7 días.

Las concentraciones liberadas fueron también evaluadas por el mismo método de HPLC. Se reportó el promedio y la desviación estándar de los compuestos en término de MP libre, dividida entre la cantidad total de MP contenida en cada uno de los compuestos sintetizados y en función del tiempo. Asimismo, se calculó el contenido de MPS liberado durante el mismo período de estudio.

## Resultados y discusión

### SÍNTESIS DE LOS MPS-DEX

El Dex es un polímero de la glucosa muy ramificado, soluble en agua que presenta excelentes propiedades fisicoquímicas en un amplio rango de pH, compatibilidad fisiológica y baja toxicidad. Para unir el Dex con la MP se requiere intercalar una cadena hidrocarbonada, que en este caso fue el grupo hemisuccinato, con la finalidad de que el grupo carboxílico, pueda reaccionar con los grupos hidroxilos libres del Dex y formar un enlace éster (Figura 1) (Larsen y

col., 2007; Hermanson, 2008). Estos enlaces son fundamentales para modificar el perfil de liberación del compuesto activo (MP) *in vivo* a nivel oftálmico, ya que se han reportado la presencia de esterasa y fosfatasa ácida a nivel intraocular (Lam y col., 1972). La presencia del MPS-Dex, incorporaría las enzimas metabólicas en la ruptura de los enlaces éster de este polímero terapéutico; retardando de esta manera la liberación de MP, y creando un posible nuevo sistema de entrega de fármaco el cual es deseado en esta investigación.

Por otra parte, la MP es un fármaco con características lipofílicas y su acoplamiento a las macromoléculas hidrosolubles de Dex, modificó favorablemente su solubilidad en agua. Esta propiedad fisicoquímica es muy importante para las formulaciones oftálmicas, donde el principal solvente y vehículo es el agua. Del mismo modo, esta característica podría evidenciar una mejor compatibilidad con los fluidos biológicos y con las estructuras intraoculares, donde se le pretende administrar este polímero terapéutico. Trabajos anteriores así lo demuestran, en donde a mayor cantidad de moléculas del fármaco con características lipofílicas unidas al Dex, menor será la solubilidad del conjugado en agua (Varshosaz y col., 2011).

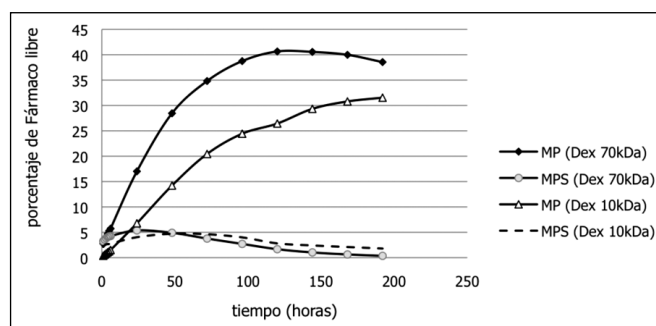
#### DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MPS

La hidrólisis básica por 20 minutos permitió separar el compuesto terapéuticamente activo de la macromolécula y se logró su cuantificación por HPLC (Anderson y col., 1984). El peso molecular del polímero fue determinante en el contenido de fármaco unido al Dex. Los porcentajes de MPS/MPS-Dex fueron: 10,786 mg MPS  $\pm$  0,28/100 mg MPS-Dex para el sistema con Dex 70 kDa y, 30,302 mg MPS  $\pm$  0,28/100 mg MPS-Dex, para el sistema con Dex 10 kDa.

Estos resultados tienen concordancia con los reportados por Varshosaz y col. (2009), en donde sintetizaron conjugados de 21-hemiglutarato de budesonida-Dex, como sistema de liberación para inflamaciones del colon. El porcentaje de acoplamiento de la budesonida al Dex fue inversamente proporcional al peso molecular del polímero empleado. Esto podría deberse a que cuando se emplea la macromolécula con un mayor peso molecular, las estructuras entrelazadas y más voluminosas, producen impedimento estérico y dificultan la interacción efectiva entre sus grupos hidroxilos y la cadena hidrocarbonada que contenía el grupo carboxílico libre (Varshosaz y col., 2011).

#### LIBERACIÓN *IN VITRO* DEL MPS DURANTE LA INCUBACIÓN CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA ISOTÓNICA DE FOSFATO

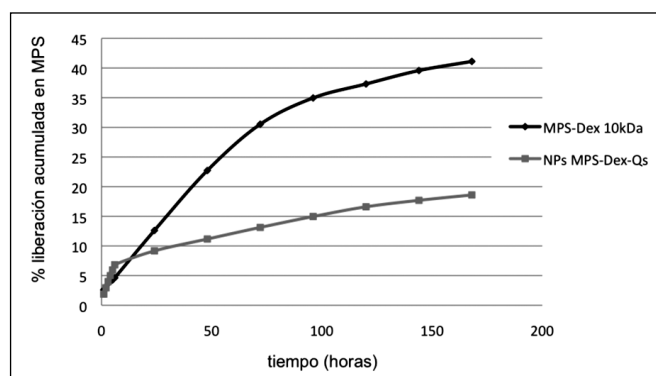
En la Figura 3 se representa gráficamente el porcentaje de fármacos liberados a pH fisiológico en fun-



**Figura 3. Perfil de liberación acumulado de la MP y el MPS en buffer fosfato isotónico pH = 7,2 a 37°C en los sistemas MPS-Dex.**

ción del tiempo, para los dos sistemas de MPS-Dex sintetizados. La liberación ocurrió hacia la formación tanto de la MP como del MPS, es decir, la hidrólisis se sucedió en los dos grupos éster de la molécula (Figura 1). Los productos de la hidrólisis obtenidos, dependen del pH del medio. A pH = 11, la reacción va dirigida a la formación de la MP exclusivamente, mientras que a pH fisiológico se hidrolizan los dos compuestos (MP y MPS). Asimismo, al alcanzar las primeras 24 h se observó, un desplazamiento del equilibrio hacia la formación de la MP y una disminución progresiva de la concentración del MPS. Este resultado es muy satisfactorio puesto que el MPS liberado se hidroliza progresivamente hacia la MP que es el compuesto terapéuticamente activo. Durante el período de estudio la concentración de MP fue cercana al 35%: 38,5%  $\pm$  2,4% para el MPS-Dex 70 kDa y 31,6%  $\pm$  3,8% para el MPS-Dex 10 kDa; observándose menor cantidad de fármaco libre en el sistema con Dex 10 kDa.

Por otra parte, en la Figura 4 se presenta la variación entre el porcentaje de liberación acumulada del MPS-Dex 10 kDa y de las NPs<sub>MPS-Dex-Qs</sub> en medio fisiológico. Como se puede observar, la encapsulación del polímero terapéutico en las NPs, permitió un retardo en la liberación del fármaco cercana al 50%, lo que es aun más favorable para esta investigación.



**Figura 4. Perfil de liberación del MPS-Dex y de las NPs<sub>MPS-Dex-Qs</sub> en buffer fosfato isotónico pH = 7,2 a 37°C.**

Esta combinación de polímeros biodegradables, biocompatibles a nivel ocular, permitió la formación de un nuevo nanosistema de liberación prolongada, que reduzca la frecuencia de administración. Ahora bien, habría que evaluar si estos importantes hallazgos son consistentes con los futuros estudios *in vivo*.

## Conclusiones

La combinación de estos polímeros hidrosolubles, podrían ofrecer un potencial terapéutico a nivel intraocular, que garantice un suministro continuo y efectivo del fármaco, reduciendo el número de dosis. Sin embargo, debe continuarse evaluando este prometedor nanosistema y compararlo con futuros estudios en presencia de fluidos biológicos, cultivos celulares y/o animales de experimentación.

## Agradecimiento

Los autores agradecen por el financiamiento de este proyecto a la Universidad Central de Venezuela (CDCH) y a la Universidad de Florida, EEUU (Department of Pharmaceutics).

## Referencias bibliográficas

- Anderson B, Conradi R, Lambert W. 1984. Carboxyl group catalysis of acyl transfer reactions in corticosteroid 17 and 21 Monoesters. *J Pharm Sci* 73 (5): 604-610.
- Andueza I. Desarrollo de un Nanosistema para la liberación de Fármacos intravítreo Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, 2012.
- Andueza I, Hochhaus G. 2013. Nanosistema Dextrano/Quitosano con potencial aplicación oftalmológica. *Rev Fac Farm UCV* 76(2): 50-57.
- Bodor N, Buchwald P. 2005. Ophthalmic drug design based on the metabolic activity of eye: soft drug a chemical delivery systems. *The AAPS J.* 7(4): Article 79 E820-E833.
- Dann R. Analysis of the metabolism of dextran-methylprednisolone succinate using *in vitro* models. Thesis. The School of Graduate Studies, Drake University, Iowa, USA, 1999.
- Duvvuri S, Majumdar S, Mitra A. 2004. Role of metabolism in ocular drug delivery. *Curr Drug Metab* 5(6): 507-515.
- Hermanson G. *Bioconjugate Techniques*. 2a ed. Elsevier: San Diego, Ca, USA, 2008.
- Lam K, Constable I, Schepens C. 1972. Subretinal fluid: Isoenzymes and cytologic studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 11(12): 1037-1043.
- Larsen C, Østergaard J, Larsen S. Controlled release - macromolecular prodrugs. In: *Prodrugs, Challenges and Rewards Part 1 and Part 2 (Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, Vol. 5)*. Eds: Stella VJ, Borchardt RT, Hageman MJ, Oliyai R, Maag H, Tilley JW. Springer: NY, 2007.
- McLeod A, Friend D, Tozer T. 1993. Synthesis and chemical stability of glucocorticoid-dextran ester: potencialprodrugs for colon-specific delivery. *Int J Pharm* 92(1-2): 105-114.
- Paolicelli P, De la Fuente M, Sánchez A, Seijo B, Alonso M. 2009. Chitosan nanoparticles for drug delivery to the eye. *Expert Opin Drug Deliv* 6(3): 239-253.
- Strickley R, Oliyai R. Formulation challenges of prodrugs. In: *Prodrugs, Challenges and Rewards Part 1 and Part 2 (Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, Vol. 5)*. Eds: Stella VJ, Borchardt RT, Hageman MJ, Oliyai R, Maag H, Tilley JW. Springer: NY, 2007.
- Varshosaz J, Emami J, Ahmadi F, Tavakoli N, Minaiyan M, Fassihi A, Mahzouni P, Dorkoosh F. 2011. Preparation of budesonide-dextran conjugates using glutarate spacer as a colon-targeted drug delivery system: *in vitro/in vivo* evaluation in induced ulcerative colitis. *J Drug Target* 19(2): 140-153.
- Varshosaz J, Emami J, Tavakoli N, Fassihi A, Minaiyan M, Ahmadi F, Dorkoosh F. 2009. Synthesis and evaluation of dextran-budesonide conjugates as colon specific prodrugs for treatment of ulcerative colitis. *Int J Pharm* 365(1-2): 69-76.
- Won C, Chu C. 1998. Dextran-estrone conjugate: synthesis and *in vitro* release study. *Carbohydr Polym* 36(4): 327-334.

**Recibido:** 18 de noviembre 2014  
**Aceptado:** 30 de marzo de 2015