

Evaluarea stabilității alendronatului de sodiu microîncapsulat în chitosan prin studii de îmbătrânire accelerată

STABILITY ASSESSMENT OF SODIUM ALENDRONATE MICROENCAPSULATED
IN CHITOSAN BY STUDIES REGARDING THE ACCELERATED AGEING

Lăcrămioara Ochiuz¹, Adrian Șpac¹, Iulian Stoleriu², Iuliana Popovici¹, GrațIELA Popa¹

¹Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

²Facultatea de Matematică, Universitatea „Al. I. Cuza”, Iași

Rezumat

Alendronatul de sodiu (AL) este unul dintre principalii reprezentanți ai bifosfonaților (Bf), agenți terapeutici administrați pentru diagnosticarea și tratarea unor afecțiuni osoase și metabolice a căror cauză constă în diferite anomalii ale homeostaziei calciului și ale procesului de resorbție osoasă. Luând în considerare caracteristicile biofarmaceutice și farmacocinetice ale alendronatului de sodiu, apreciem că microîncapsularea sa în chitosan (CHT) conduce la optimizarea acestor proprietăți și la creșterea complianței la tratament. Obiectivele acestei cercetări constă în evaluarea stabilității AL încapsulat în CHT, prin studii de îmbătrânire accelerată, conform recomandărilor din ghidurile internaționale pentru estimarea perioadei de valabilitate a unui preparat farmaceutic. Cercetările au fost realizate pe două formulări de sisteme terapeutice microparticulate în care raportul AL:CHT a fost de 1:1, pentru formula notată cu F1 și de 1:4 pentru formula notată F2. Rezultatele testelor au evidențiat o perioadă de valabilitate de 1,9 ani, pentru formula F1 și respective de 2,8 ani pentru formula F2. În concluzie, creșterea cantității de CHT din formulă determină mărirea perioadei de valabilitate și creșterea stabilității AL. Această influență a fost demonstrată și prin alte studii de evaluare a stabilității, publicate anterior.

Cuvinte cheie: alendronat, chitosan, microparticule, stabilitate

INTRODUCERE

Alendronatul de sodiu (AL) este unul dintre principalii reprezentanți ai bifosfonaților (Bf), agenți terapeutici administrați pentru diagnosticarea și tratarea unor afecțiuni osoase și metabolice a căror cauză constă în diferite anomalii ale homeostaziei calciului și ale

procesului de resorbție osoasă. În prezent, AL este utilizat în terapie sub formă de comprimate cu cedare convențională cu administrare zilnică (10 mg/comp.) sau săptămânală (70 mg/comp. unic sau asociat cu 2 800 U.I. vit.D₃) și sub formă de soluție (70 mg/fl.). Principalul dezavantaj terapeutic al AL-Na constă în

Adresa de corespondență:

Lăcrămioara Ochiuz, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Str. Universității nr. 16, cod 700115, Iași
E-mail: ochiuzd@yahoo.com

biodisponibilitatea orală redusă (0,6 -0,9 %) cauzată de o serie de factori dintre care menționăm: apartenența la clasa a III-a biofarmaceutică (BCS) (substanță hidrosolubilă cu permeabilitate membranară redusă determinată de încărcatura negativă a moleculei), $T_{\frac{1}{2} \text{ plasm.}} = 0,5-2$ h și chelatarea de către ionii de Ca^{2+} cu formarea unor complecși neabsorbabili (1-4).

Datele publicate în domeniul microîncapsulării prezintă unele cercetări efectuate pe diverși reprezentanți ai bifosfonaților, prin care s-a studiat diminuarea efectelor adverse și creșterea biodisponibilității substanței active (5,6). Un număr mare cercetări a fost efectuat pentru microîncapsularea bifosfonaților în diferiți polimeri hidrofilii, de exemplu alginatului, poli (vinilpirolidona), carboximetilceluloză sodică, hidroxietilceluloza, metilceluloza, poli (alcool vinilic), derivați acilați, precum și în substanțe hidrofobe de exemplu: etilceluloza, polietilena, polimetacrilatii, nitratul de celuloză, substanțele siliconice, poli (lactid-co-glicolidele), cerurile, gliceril-stearații, alcoolul stearilic, acidul stearic (7-12). Luând în considerare caracteristicile biofarmaceutice și farmacocinetice ale alendronatului de sodiu, apreciem că microîncapsularea sa în chitosan (CHT) conduce la optimizarea acestor proprietăți și la creșterea complianței la tratament.

Obiectivele acestei cercetări constă în evaluarea stabilității AL încapsulat în CHT, prin studii de îmbătrânire accelerată, conform recomandărilor din ghidurile internaționale pentru estimarea perioadei de valabilitate a unui preparat farmaceutic (13,14).

MATERIALE ȘI METODE

Materiale

Alendronat de sodiu trihidrat (Apotex Pharmaceuticals Inc., Canada), *chitozan practical grade*, grad de deacetilare > 85% (Aldrich, Germany), *acid acetic glacial* și alți reactivi (calitate F.R. X).

Metode

Prepararea sistemelor microparticulate cu AL pe bază de CHT

Microparticulele de CHT cu AL au fost formulate în două proporții substanță activă: polimer (m/m) 1:1 și 1:4 notate F1 și F2. Inițial a fost preparată o soluție de acid acetic 1% (v/v) în care am dizolvat, prin agitare continuă, CHT și ulterior, alendronatul de sodiu corespunzător fiecărei formule. În etapa următoare, soluțiile au fost pulverizate cu ajutorul aparatului Mini Spray Dryer B290 (Büchi, Elveția) în următoarele condiții de lucru: temperatura de admisie $180 \pm 2^\circ\text{C}$,

temperatura de evacuare $100 \pm 2^\circ\text{C}$, flux curgere lichid 7,3 ml/min, flux curent aer 536 l/h. Menționăm că sistemele microparticulate cu AL au fost caracterizate și evaluate farmacotehnic. Rezultatele acestor studii au fost evidențiat o eficacitate a microîncapsulării de peste 95 %. Testele de dizolvare *in vitro* au confirmat proprietățile și comportamentul CHT în medii diferite de pH. În mediul de simulare a fluidelor gastrice, datorită fenomenului de protonare, CHT se dizolvă mult mai repede comparativ cu mediul de simulare a fluidelor intestinale, ceea ce favorizează hidratarea rapidă și cedarea substanței medicamentoase cu o viteză mare. La pH 6,8, de simulare a fluidelor intestinale, sistemele terapeutice microparticulate pe bază de CHT s-au hidratat foarte lent, fiind înregistrată o cedare de 100% a alendronatului de sodiu abia după 180 min. Viteza de cedare a alendronatului de sodiu din sistemele terapeutice microparticulate studiate, variază invers proporțional cu raportul de CHT din formulă (15).

Expunerea sistemelor microparticulate la stresul termic

Loturi a 30 g din fiecare formulă au fost termostatate, timp de 6 luni, în următoarele condiții:

- temperatura $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, umiditate relativă $75\% \pm 2\%$;
- temperatura $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, umiditate relativă $75\% \pm 2\%$;
- temperatura $65^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, umiditate relativă $75\% \pm 2\%$.

Pe parcursul celor 6 luni, la intervale de 10 zile, au fost prelevate câte șase probe din fiecare formulă analizată. Ulterior, a fost determinat cantitativ procentul de substanță activă prin raportare la conținutul inițial de alendronat de sodiu din sistemele terapeutice microparticulate.

Determinarea cantitativă a alendronatului de sodium

S-a realizat printr cromatografie de lichide de înaltă performanță, în următoarele condiții de lucru: separarea cromatografică pe o coloană Zorbax StableBond SB C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm) folosind o fază mobilă formată din amestec de metanol / acetonitril / apă, în raport de 17,5/17,5/65 și un debit de 0,3 mL/min.; 30°C – temperatura din compartimentul coloanei; volumul de soluție injectată = 20 μL ; detecția se realizează în UV la o lungime de undă de 266 nm. Validarea metodei de determinare cantitativă a alendronatului prin cromatografie de lichide de înaltă performanță a fost realizată prin determinarea următorilor parametri: *identificarea produsului de reacție a alendronatului cu reactivul 9-FMC* din cromatogramele soluțiilor de probă prin compararea

timpilor de retenție (pentru cromatograma soluției etalon, respectiv probă) și a spectrelor de absorbție în UV. De asemenea, am verificat puritatea picului din soluțiile de probă prin metoda curbei de similaritate; *liniaritatea* funcției de răspuns (s-a urmărit modificarea ariei picului în funcție de concentrația injectată). Funcția de răspuns este liniară pe domeniul studiat (2,5-80 μg/mL); *repetabilitatea injecției (precizia sistemului)* pentru un număr de 4 determinări, valoarea deviației standard relative fiind de 1,5312%; *repetabilitatea analizei (precizia metodei)* pentru trei soluții independente la trei niveluri de concentrație diferite (2, 5, 20 și respectiv 40 μg/mL) pentru care valoarea deviației standard relative este de 3,6395; *exactitatea* calculată prin regăsirea pentru un număr de trei probe la trei niveluri de concentrație diferite obținându-se o regăsire medie de 103,4% pe intervalul 98,7-109%.

Determinarea perioadei de valabilitate

Concentrațiile AL determinate în cele 18 momente ale testului pentru fiecare temperatură de expunere au fost reprezentate grafic în funcție de timp. Din ecuația dreptei de regresie am estimat valoarea constantei vitezei de degradare corespunzătoare fiecărei temperaturi de expunere, pentru modelul cinetic de ordin zero. Constanta vitezei de degradare pentru modelul cinetic de ordinul întâi a fost calculată ca fiind panta dreptei de regresie a lnC în funcție de timp. Constanta vitezei de degradare la temperatura camerei a fost estimată printr-un model de regresie liniară a constantelor calculate pentru cele trei valori experimentale de temperatură și temperaturile corespunzătoare.

Perioada de valabilitate a sistemelor microparticulate cu AL pe bază de CHT a fost calculată pentru fiecare model cinetic prin aplicarea următoarelor ecuații:

– degradare conform cineticii de ordinal zero

$$t_{90\%} = \frac{C_0}{10k} \quad (1)$$

în care:

$t_{90\%}$ – timpul necesar degradării a 10% din concentrația inițială de AL;

k – constanta vitezei de degradare a AL conform unei cinetici de ordin zero

C_0 – concentrația inițială a AL.

– degradare conform cineticii de ordinul întâi

$$t_{90\%} = \frac{0,105}{k} \quad (2)$$

în care:

$t_{90\%}$ – timpul necesar degradării a 10% din concentrația inițială de AL;

k – constanta vitezei de degradare a AL conform unei cinetici de ordinul întâi.

Din panta dreptei de regresie am calculat valoarea energiei de activare a procesului conform ecuației:

$$p = \frac{-Ea}{R} \quad (3)$$

în care:

p – panta dreptei de regresie;

R – constanta gazelor ideale (8,31 J/mol * K)

Ea – energia de activare.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conform datelor obținute în urma efectuării testelor de îmbătrânire accelerată formula F1 a sistemelor terapeutice microparticulate are o perioadă de valabilitate mai mică de 2 ani, indiferent de ordinul de reacție a degadării alendronatului de sodium (Fig. 1). Ecuațiile dreptelor de regresie pentru fiecare temperatură de expunere și parametrii cineticii de ordin zero și respectiv de ordinul I sunt redați în Tabelele I și II.

Rezultatele obținute în cazul formulei F2 a sistemelor terapeutice microparticulate (Fig. 2 și Tabelele III și IV) demonstrează o stabilitate superioară a alendronatului de sodiu comparativ cu formula F1.

TABELUL I. Parametrii cineticii de degradare de ordin zero pentru formula F1

Temp. (°C)	Ecuația dreptei de regresie	R ²	K (temp. 20°C)	t _{90%} (ani)	Ea (Kj/mol)
40	y = -0,014379*t + 99,9841	0,98287	-0,014488	1,8911	39,0716
50	y = -0,011691*t + 99,7727	0,98276			
65	y = -0,012926*t + 99,5439	0,94642			

TABELUL II. Parametrii cineticii de degradare de ordinul întâi pentru formula F1

Temp. (°C)	Ecuația dreptei de regresie	R ²	K (temp. 20°C)	t _{90%} (ani)	Ea (Kj/mol)
40	y = -0,00014565*t + 4,6051	0,98324	-14,641*10 ⁻⁵	1,9648	38,4465
50	y = -0,00011839*t + 4,6029	0,98318			
65	y = -0,00013125*t + 4,6006	0,94774			

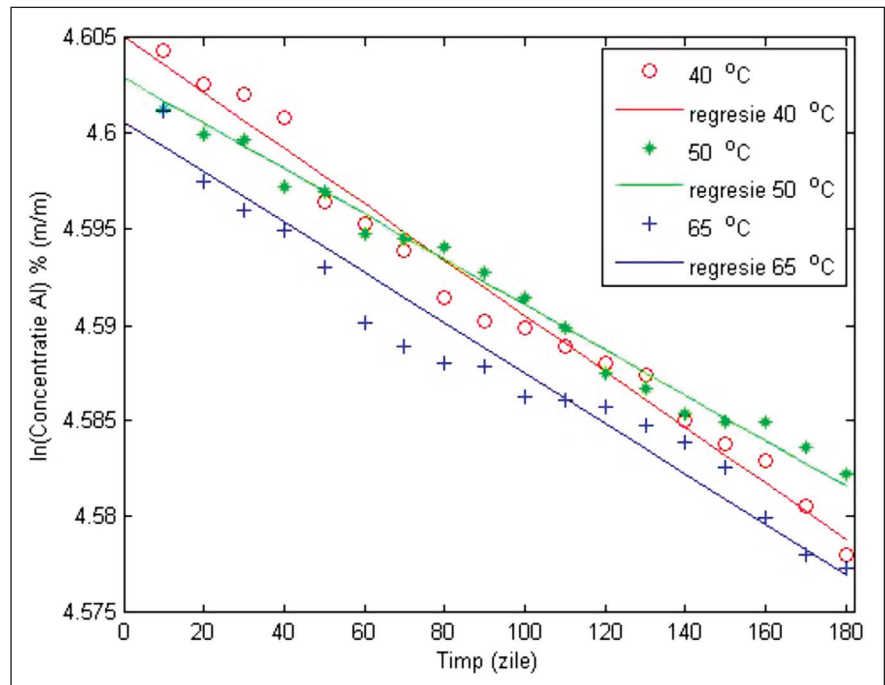


FIGURA 1. Concentrația AL în proba F1 a sistemelor microparticulate pe parcursul testului de îmbătrânire accelerată

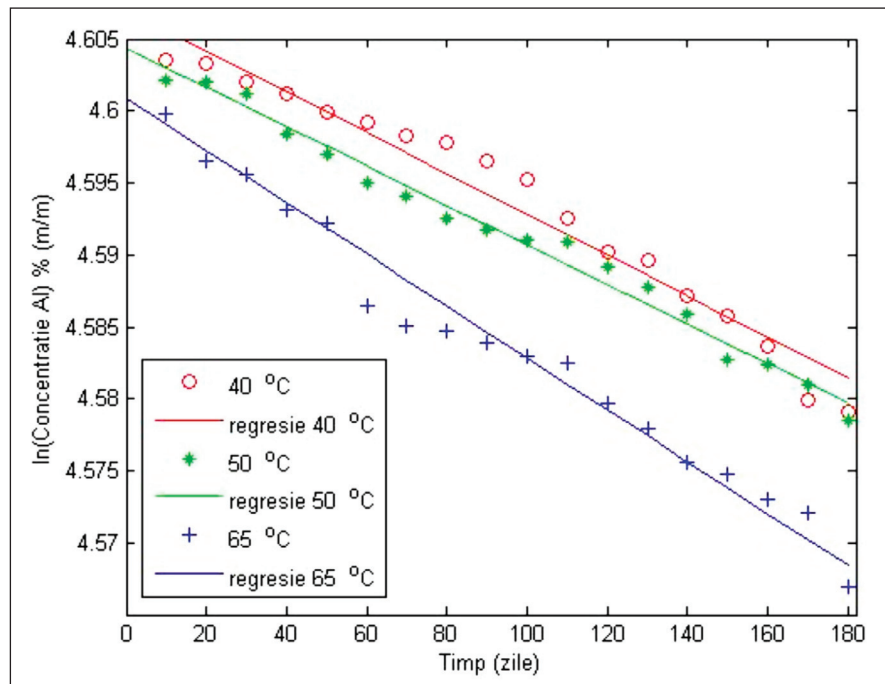


FIGURA 2. Reprezentarea logaritmică a concentrației AL – F2 pe parcursul testului de îmbătrânire accelerată

TABELUL III. Parametrii cineticii de degradare de ordin zero pentru formula F2

Temp. (°C)	Ecuția dreptei de regresie	R ²	K (temp. 20°C)	t _{90%} (ani)	Ea (KJ/mol)
40	$y = -0,014039 * t + 100,1772$	0,96494	-0,010151	2,699	129,3997
50	$y = -0,013533 * t + 99,9154$	0,98729			
65	$y = -0,017674 * t + 99,5617$	0,96946			

TABELUL IV. Parametrii cineticii de degradare de ordinul întâi pentru formula F2

Temp. (°C)	Ecuatia dreptei de regresie	R ²	K (temp. 20°C)	t _{90%} (ani)	Ea (Kj/mol)
40	y = -0,00014211*t + 4,607	0,96377	-10,148*10 ⁻⁵	2,8347	135,6346
50	y = -0,00013714*t + 4,6044	0,98718			
65	y = -0,00018025*t + 4,6008	0,97046			

Perioada de valabilitate estimată prin ambele modele cinetice este mai mare de 2,5 ani și putem aprecia că o creștere a concentrației CHT în formula sistemelor terapeutice microparticulate determină o mărire a perioadei de valabilitate a preparatului farmaceutic, prin creșterea stabilității AL microîncapsulat.

CONCLUZII

Testele de îmbătrânire accelerată au o semnificație orientativă, în conformitate cu specificațiile legislative, care recomandă și efectuarea testelor de stabilitate în condițiile recomandate de păstrare pentru un preparat

farmaceutic nou sau o substanță medicamentoasă nouă. Pentru formula F1 a sistemelor terapeutice microparticulate AL pe bază de CHT am obținut o perioadă de valabilitate de 1,95 ani în timp ce, pentru formula F2, cu un conținut mai mare de CHT, perioada de valabilitate calculată este mai mare de 2,5 ani. Acest rezultat poate fi explicat prin microîncapsularea moleculei de AL în CHT, pentru care am demonstrat o stabilitate termică la temperaturi foarte mari ($\leq 600^\circ\text{C}$), creșterea cantității de CHT din formulă determinând o creștere a stabilității AL și o mărire a perioadei de valabilitate.

BIBLIOGRAFIE

- Roelofs AJ, Ebetino HF, Reszka AA.** – Bisphosphonates: Mechanism of Actions, in Bilezikian JP, Raisz Martin T J (eds), Principles of Bone Biology. 3rd edition, New York: Academic Press Inc., 2008; 333-368
- Binkley N., Ringe J.D., Reed J.I.** – Alendronate/vitamin D3 70/2800 with and without additional 2800 IU vitamin D3 for osteoporosis: results from the 24-week extension of a 15-week randomized, controlled trial. *Bone* 2009; 44:639-647
- Cremers S., Papapoulos S.** – Pharmacology of bisphosphonates. *Bone* 2011; 49:42-49
- Katsumi H., Nakatani M., Sano JI et al.** – Absorption and safety of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, after intrapulmonary administration in rats. *Int. J. Pharm.* 2010; 400:124-130
- Samdancioglu S., Calis S., Sumnu M., Hincal A.** – Formulation and in vitro evaluation of bisphosphonate loaded microspheres for implantation in osteolysis. *Drug Develop. and Ind. Pharm.*, 2006; 32:473-481
- Mani N., Park M.O., Jun H.W.** – Microencapsulation of a hydrophilic drug into a hydrophobic matrix using a salting-out procedure. I: Development and optimization of the process using factorial design. *J. Microencapsulation*, 2004; 21(2):125-35
- Yoon Y., Kinam P.** – Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Pharm. Res.* 2004; 27(1): 1-12
- Sinha V., Bansal K. et al.** – Polycaprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *Int. J. Pharm.* 2004; 278:1-23
- Molpeceres J., Aberturas M.R., Guzman M.** – Biodegradable nanoparticles as a delivery system for cyclosporine: preparation and characterization. *J. Microencapsul.* 2000; 17(5):599-614
- Vauthier C., Dubernet C. et al.** – Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv. Drug. Del. Rev.* 2003; 55(4):519-548
- Giunchedi P, Juliano C et al.** – Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared resing drug-loaded chitosan microspheres. *Eur. J. Pharm. Biofarm.* 2002; 53:233-239
- Weidenauer U., Bodmers D., Kissel T.** – Microencapsulation of hydrophilic drug substances using biodegradable polyesters. Part I: Evaluation of different techniques for the encapsulation of Pamidronate di-sodium salt. *J. Microencapsulation* 2003; 20(4):509-524
- *** – ICH Topic Q1 A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, accessed via the internet at: www.emea.europa.eu/pdfs/human
- *** – Guidance for Industry Q1 A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, accessed via the internet at: www.fda.gov/downloads/regulatoryinformation/guidance
- Lăcrămioara Ochiuz, Peris J.E.** – Preparation and Characterisation of Alendronate-Loaded Chitosan Microparticles Obtained through the Spray Drying Technique *Medicinal Chemistry* 2009; 5(2):191-196