



## Viscosidad y Tamaño de Partícula de Una Preparación Clínica de Surfactante Pulmonar

Odalys BLANCO H. <sup>1\*</sup>, Iván MORALES L. <sup>2</sup>, Arturo TOLEDO R. <sup>3</sup>, Wilma ALFONSO L. <sup>1</sup>,  
Elaine DÍAZ C. <sup>1</sup> & Roberto FAURE G. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Química-Farmacología-Toxicología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria,  
CENSA, San José de Las Lajas, CP 32 700, La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos,  
CIDEM, Ciudad de la Habana, CP 10400, Cuba

<sup>3</sup> LIORAD Ciudad de la Habana, CP 10400, Cuba

**RESUMEN.** Se evaluó la reología y el tamaño de partícula de una preparación de surfactante pulmonar conocida como Surfacen® a una concentración de 25 mg/mL a las temperaturas de 23 y 37 °C y se estudió el efecto de la liofilización y de la adición de colesterol en el comportamiento reológico. Surfacen® mostró una viscosidad de 2,54 y 1,98 mPa.s a 23 y 37 °C, respectivamente. El análisis del tamaño de la partícula evidenció tres poblaciones de partículas en los intervalos de 0,04-0,4 μm, 2-15 μm, y de 40-200 μm. Surfacen® mostró una dependencia mínima de la viscosidad en función del gradiente de velocidad de cizalla, con una tendencia a un comportamiento newtoniano. La adición de colesterol no alteró dicho comportamiento, pero el proceso de liofilización disminuyó la viscosidad de la formulación.

**SUMMARY.** "Viscosity and Particle Size of a Lung Surfactant Clinical Preparation". The rheology and particle size of a lung surfactant preparation called Surfacen® was tested at concentration of 25 mg/mL at 23 and 37 °C; the effect of lyophilization and the addition of cholesterol on viscosity was also assayed. Surfacen® showed viscosity values of 2.54 and 1.98 mPa.s at 23 and 37 °C, respectively. Evaluation of particle size indicated that pharmaceutical phospholipids dispersion exhibited three populations of particle at range of 0.04-0.4 μm, 2-15 μm, and 40-200 μm. Surfacen® showed minimal dependence of viscosity on shear rate, with the tendency to newtonian behavior. The addition of cholesterol did not influence in the rheological behavior, the lyophilization processes decrease the viscosity in Surfacen® formulation.

### INTRODUCCIÓN

El surfactante pulmonar es una mezcla compleja de fosfolípidos y proteínas específicas. Su función fundamental es disminuir la tensión superficial en la interfase aire-líquido del alveolo, evita el colapso alveolar y por tanto permite una respiración normal <sup>1,2</sup>. Además se le atribuye una función de defensa en el pulmón frente a patógenos, evitando la inflamación e infección <sup>3,4</sup>.

Las preparaciones exógenas de surfactante pulmonar se emplean eficazmente en la terapéutica del Síndrome de Distress Respiratorio del Neonato (SDRN) <sup>4,5</sup>. Independientemente del uso clínico amplio de estas preparaciones dirigidas al SDRN, investigaciones básicas revelan marcadas diferencias en la composición bioquímica y en la propiedad biofísica de las mismas <sup>6,7</sup>, lo cual repercute en su eficacia clínica <sup>8,9</sup>. El conocimiento de sus propiedades reológi-

cas es de gran importancia teniendo en cuenta que estas suspensiones o dispersiones liposomales de fosfolípidos son suministradas por intubación endotraqueal con la que se debe garantizar una buena distribución a nivel alveolar en el pulmón <sup>10</sup>. La reología de estas preparaciones es compleja, al ser una mezcla de fosfolípidos y proteínas lo cual ha sido reportado <sup>11-13</sup>.

El presente estudio tiene como objetivo conocer el comportamiento reológico de la preparación así como el tamaño de partícula de una preparación clínica de surfactante exógeno cuyo nombre comercial es Surfacen® a su concentración terapéutica así como evaluar el efecto que produce el proceso de liofilización y de la adición de colesterol en dicho comportamiento.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Surfacen® es un extracto lipídico obtenido a partir de lavado pulmonar porcino y se presenta

**PALABRAS CLAVE:** Surfacen®, Surfactante pulmonar, Tamaño de partícula, Viscosidad.

**KEY WORDS:** Lung surfactant, Particle size, Surfacen®, Viscosity.

\*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. *E-mail:* oblanc@cenca.edu.cu

en forma de un liofilizado estéril de color blanco que contiene 50 mg de fosfolípidos, 2-3 mg de otros lípidos y 0,3-0,7 mg de proteínas hidrofóbicas<sup>14</sup>. Se resuspende en 2 mL de agua para inyección para obtener una concentración de 25 mg/mL, utilizando aguja N° 21; una vez resuspendido se deja 30 min en reposo. Se obtiene y suministra por el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

### Medidas reológicas

Se empleó un reómetro (Haake, modelo RV20) ajustado a una velocidad de cizalla comprendida entre 85,25 y 683,6 s<sup>-1</sup>, durante 2 min, empleando el sistema de medición M5 y el sensor NV std. El equipo está acoplado a un ordenador mediante un Rheocontroller RC 20 (Haake) utilizado como interfase y el software Rot 2.3. Está acoplado, además, a un ultratermostato (Haake, modelo F-3) para el control de la temperatura. Se hicieron mediciones de Surfacen® a la concentración de 25 mg/mL a 23 y 37 ± 0.1 °C. Se analizó, además, el efecto de la liofilización en la formulación de Surfacen® al realizar las determinaciones fluidimétricas en la suspensión de Surfacen® antes de liofilizar. Se adicionó colesterol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) al 5% con relación al contenido total de fosfolípido del producto después de reconstituido.

### Mediciones del tamaño de partícula

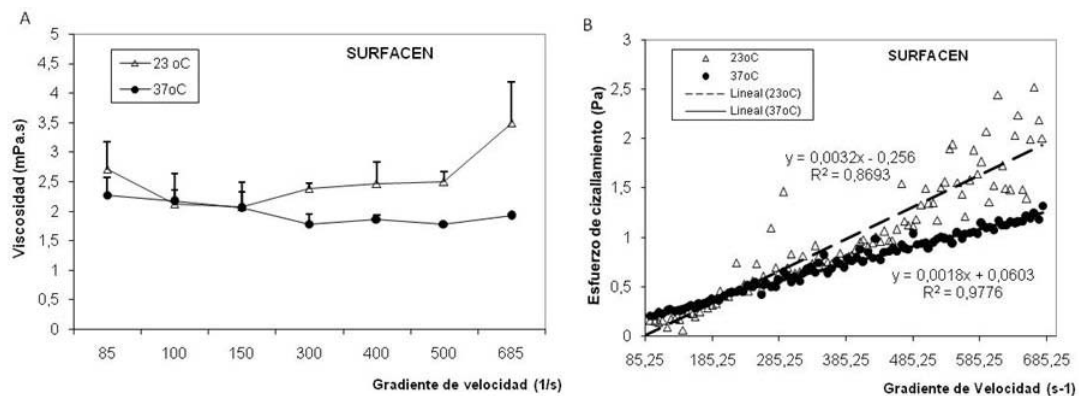
Se realizó en un analizador de tamaño de partícula por difracción de luz tipo Coulter modelo LS 230 capaz de medir un rango entre 0,4-2000 µm. El mismo incorpora además una técnica de medición del diferencial de intensidad resultante del espectro de dispersión de luz blanca polarizada (PIDS) que amplía el rango a un valor mínimo de medición de 0,04 µm. Se emplearon volúmenes de muestra de 200 µL de

Surfacen® a 25 mg/mL y con colesterol y para el empleo del PIDS se elaboró un modelo óptico basado en un índice de refracción de la fase sólida de 1,45 y 1,33 correspondiente al medio acuoso de dispersión.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La viscosidad no es más que la resistencia que ofrece un material o sustancia a fluir. Las propiedades reológicas o de flujo de sistemas dispersos farmacéuticos se clasifican en newtonianos y no newtonianos; a su vez estos últimos pueden ser pseudoplásticos, plásticos y dilatantes. Un flujo newtoniano es aquel que su viscosidad no varía en función de la velocidad de cizalla, es decir se mantiene constante. El pseudoplástico es aquel que a medida que aumenta la velocidad de cizalla tiende a disminuir la viscosidad<sup>15</sup>.

El comportamiento reológico de Surfacen® se muestra en la Figura 1. A las temperaturas ensayadas, los valores de viscosidad del producto presentan una dependencia mínima en función del gradiente de velocidad de cizalla, con una tendencia a un comportamiento newtoniano evidenciado mejor a 37 que a 23 °C, el comportamiento presentado a 23 °C puede justificarse por el fenómeno de los "vórtices de Taylor" el cual se manifiesta en fluidos newtonianos o con una fuerte tendencia a ser newtonianos y que además presenten una viscosidad baja, los cuales a alta velocidad de cizalla dejan de comportarse como un fluido laminar convirtiéndose en no laminares dando la apariencia de un flujo dilatante. La viscosidad depende de múltiples factores, tales como el tipo de sustancia, la temperatura, la fuerza iónica, la metodología de dispersión y la forma farmacéutica. El análisis de estos factores en cualquier formulación farmacéutica no es sencillo, particularmente en el



**Figura 1.** Comportamiento reológico de Surfacen®. Dependencia viscosimétrica (A) y fluidimétrica (B) en función de la velocidad de cizalla ( $\dot{\gamma} = s^{-1}$ ) a 37 y 23 °C. Surfacen® muestra una tendencia a un comportamiento newtoniano a 37 °C mejor que a 23 °C. Los datos de las curvas viscosimétrica representan la media  $\pm$  ES.

contexto de las preparaciones farmacéuticas de surfactante pulmonar adquiere una complejidad importante <sup>12,13</sup>. No son muchos los estudios donde se evalúan las preparaciones farmacéuticas de surfactante pulmonar en cuanto a sus propiedades viscosimétricas <sup>11-13</sup>, sino que se ha investigado más con relación a la viscosidad de superficie de las mismas <sup>7,16,17</sup>. La composición bioquímica de los surfactantes clínicos (cuyos nombres comerciales son Survanta®, Curosurf®, Infasurf®, Alveofact® y Bles®) en general se caracterizan por un alto contenido de fosfolípidos, particularmente fosfatidilcolina y su especie disaturada, la dipalmitoilfosfatidilcolina. A su vez contienen un porcentaje elevado de fosfolípidos aniónicos específicamente fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol y un 1% de proteínas hidrofóbicas, conocidas como SP-B y SP-C. En el caso del surfactante clínico Survanta®, es suplementado con ácido palmítico y tripalmitina, que constituyen elementos minoritarios en el surfactante endógeno, estos aditivos incrementan la viscosidad del mismo <sup>13</sup>. También se ha encontrado niveles significativos de plasmalógenos <sup>18</sup>. A pesar de estos aspectos comunes, existen diferencias en su composición debido al método de obtención y fuente de manera que las proporciones de cada uno de los componentes que se establecen en estas preparaciones es diferente <sup>6,7</sup>.

El comportamiento reológico de las preparaciones de surfactante potencialmente influye en su suministro y distribución en el pulmón y varía en dependencia de su composición. Se conoce que los fosfolípidos pueden formar bicapas, micelas, vesículas lamelares y unilamelares. Las proteínas hidrofóbicas tienen una influencia decisiva en la microestructura de esos agregados. Existe un comportamiento reológico diferente entre mezclas de fosfolípidos solos en comparación con las preparaciones de surfactante. Las preparaciones estudiadas (Survanta®, Infasurf®) exhiben un comportamiento no newtoniano al igual que el surfactante natural endógeno, pero a su vez existen diferencias entre ellas en cuanto a los valores absolutos de viscosidad, siendo el surfactante pulmonar endógeno el de menor viscosidad con valores de 4,65 a 70 s<sup>-1</sup> y de 2,42 a 770 s<sup>-1</sup>, le sigue el Infasurf® con 12,5 a 70 s<sup>-1</sup> y de 4,74 a 770 s<sup>-1</sup> y el de mayores valores fue Survanta® con 28,8 a 70 s<sup>-1</sup> y 9,1 a 770 s<sup>-1</sup> a 37 °C. El efecto de la temperatura incide decisivamente en el comportamiento de estas preparaciones, la fluidez de los fosfolípidos depende de la temperatura en dos sentidos, uno debido a factores termodinámicos y otro a su comportamiento de fases característico de la

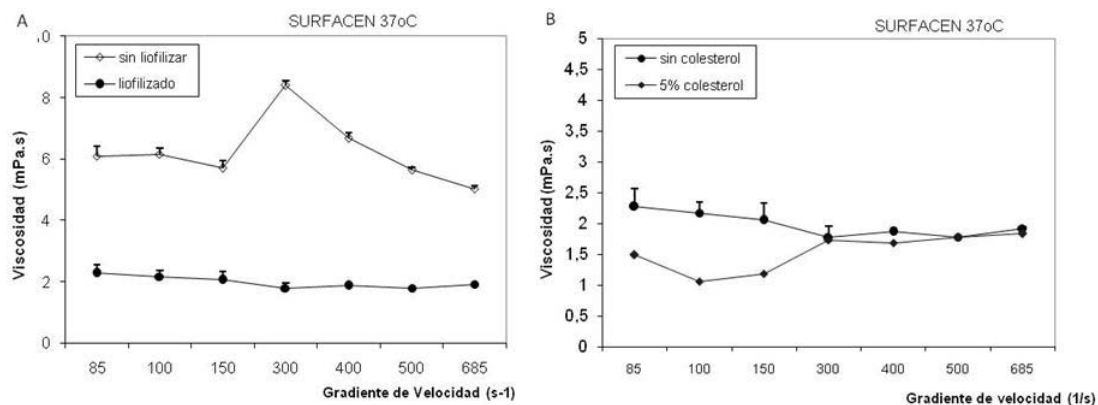
molécula de fosfolípido lo cual a su vez es modificado por su interacción con las proteínas del surfactante pulmonar. Resultados con Survanta® a una velocidad de cizalla fija mostraron una mayor viscosidad a la temperatura de 23 °C en comparación con la temperatura fisiológica (37 °C), sin embargo Infasurf® a 37 °C mostró un comportamiento no-newtoniano mientras que a 23 °C la viscosidad no dependió de la velocidad de cizalla y presentó una menor viscosidad (15,8 vs 2.61 mPa.s a 150 s<sup>-1</sup>, respectivamente) <sup>13</sup>. Nuestros resultados muestran que Surfacer® es una preparación con baja viscosidad tanto a 37 como 23 °C (Tabla 1), por tanto su viscosidad es menor que la informada para otros surfactantes comerciales y similar al surfactante endógeno.

Asimismo se ha reportado diferencia en la viscosidad de superficie entre las preparaciones de surfactante, Survanta® y Curosurf®, lo cual demuestran estar relacionado con el hecho que el primero tiene el menor contenido de los componentes que disminuyen la viscosidad de la monocapa o de superficie, tales como plasmalógeno, fosfolípidos poli-insaturados y la proteína SP-B, en adición tiene las mayores concentraciones de fosfolípidos saturados en relación al Curosurf® <sup>7</sup>.

En la Figura 2A se muestra el comportamiento viscosimétrico de la formulación de Surfacer® antes y después de realizarle el proceso de liofilización y en la 2B el efecto de la adición de colesterol en la viscosidad de la formulación final a 37 °C. Surfacer® sin liofilizar presenta un comportamiento reológico similar al producto final, debido a que presenta una dependencia mínima en función del gradiente de velocidad de cizalla, con una tendencia a un comportamiento newtoniano, sin embargo es de destacar que presenta una viscosidad más elevada (6,23 mPa.s). Es interesante destacar la zona de velocidad de cizalla comprendida entre 250 y 385 s<sup>-1</sup> lo cual pudiera interpretarse como que las estructuras presentes se agrupan más, hay menos solvente y por tanto la viscosidad aumenta, una vez que sigue incrementándose la velocidad de cizalla retorna y se mantiene el

Surfactante	Temperatura	Viscosidad (mPa.s) a la velocidad de cizalla inicial y final	
		85,25 s <sup>-1</sup>	683,6 s <sup>-1</sup>
Surfacer®	37 °C	2,28 ± 0,28	1,92 ± 0,028
	23 °C	2,71 ± 0,46	3,5 ± 0,9

**Tabla 1.** Valores de la viscosidad de Surfacer®.

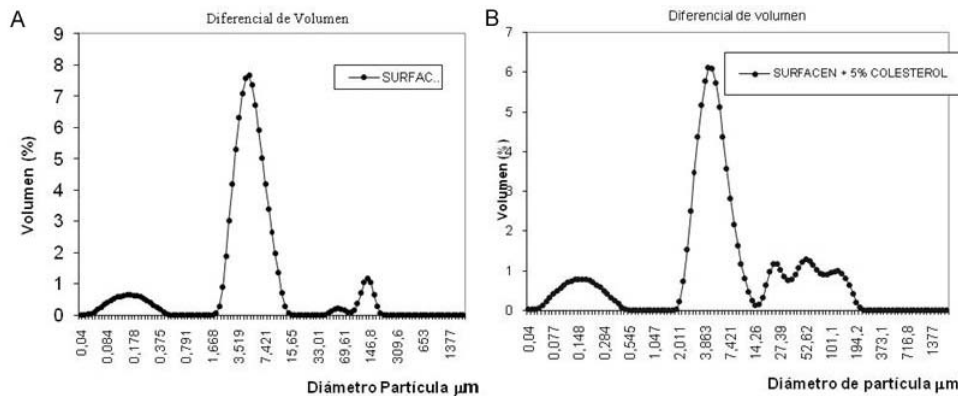


**Figura 2.** Comportamiento viscosimétrico de Surfacen® antes de liofilizar (A). Efecto de la adición de colesterol (5% en relación a fosfolípidos totales) en la viscosidad de la formulación final de Surfacen® (B).

comportamiento inicial. En cuanto a la adición de colesterol observamos que su incorporación al 5% en la suspensión de Surfacen® no afecta las propiedades reológicas del mismo. Estudios realizados para investigar la contribución de los componentes lipídicos del surfactante a la viscosidad de estas preparaciones han evidenciado que las mezclas de fosfolípidos con un 4% de colesterol presentan una baja viscosidad, sin embargo, la adición de ácido palmítico o tripalmitina incrementan significativamente la viscosidad de los fosfolípidos. Se ha descrito que las mezclas de fosfolípidos similares al surfactante con un 4% de colesterol exhiben una baja viscosidad que varía muy poco con la velocidad de cizalla<sup>13</sup>. El colesterol es un constituyente del surfactante pulmonar endógeno que es prácticamente eliminado en el proceso de obtención y purificación de los surfactantes exógenos naturales, no obstante se encuentra en trazas, aunque en el surfactante Infasurf® su nivel se aproxima al endógeno, de manera tal que el contenido de colesterol en estas preparaciones es extremadamente diferente<sup>7</sup>. La presencia de colesterol tiene importantes implicaciones en la organización de la estructura lateral de membranas de estos productos<sup>19</sup>, por lo que se le atribuyen importantes funciones en la estabilidad y mecánica pulmonar que pudieran adquirir una relevancia fundamental en el contexto de otras patologías respiratorias.

Existe una relación entre tamaño, distribución de partícula y volumen de fracción con la viscosidad, siendo parámetros físicos claves en las suspensiones farmacéuticas, a medida que el tamaño de las partículas es más pequeño, aumenta el número de estas y por tanto la interacción entre partículas lo que conlleva a un aumento de la resistencia a fluir y por consiguiente aumenta la viscosidad. La distribución del ta-

maño de partícula influye en el empaquetamiento de las partículas, una población poli-dispersa con una distribución de tamaño amplia empaqueta más estrechamente que una muestra mono-dispersa en este sentido el incremento en la distribución del tamaño de partícula puede reducir la viscosidad de un sistema. Se ha reportado que las suspensiones de surfactantes clínicos presentan una distribución amplia de tamaño encontrándose diferencias entre las mismas, en este sentido Curosurf® consiste en agregados multilamelares con una distribución de tamaño amplia en el rango de 100 nm a 3 µm, sin embargo Infasurf® consiste en vesículas unilamelares mono-dispersas con un diámetro de 250 nm ±100 nm, las cuales son atrapadas unas con otras para formar partículas en el rango de 0.5 a 4 µm y Survanta® presentó los mayores agregados los cuales fueron muy grandes para ser cuantificados por microscopía electrónica de transmisión con congelación de fractura, además presentó vesículas unilamelares pequeñas en el orden de 50–300 nm<sup>20</sup>. Análisis del tamaño de partícula de Surfacen® relativo al volumen comprendió los siguientes intervalos: 0,04 a 0,4 µm, 2 a 15 µm, y de 40 a 200 µm (Fig. 3A), lo que constituye una formulación surfactante pulmonar con distribución de tamaño de partícula heterogénea, lo cual coincide con lo informado para este tipo de preparaciones<sup>20</sup>. Los sistemas lipídicos surfactantes son complejos lo que se evidencia en las diferentes estructuras que adopta desde que son secretados por los neumocitos tipo II que al ponerse en contacto con la hipofase acuosa adopta una estructura única conocida como mielina tubular y posteriormente adopta formas de liposomas multilamelares, miscelas, en el transcurso de su instilación por la vías aéreas superiores atravesando por diferentes velocidades de cizalla hasta llegar



**Figura 3.** Distribución del tamaño de partícula en función del volumen de Surfacen® (A) y de Surfacen con 5% de colesterol (B).

al nivel alveolar donde al cumplir con su función tensoactiva en los procesos de inspiración-expiración adopta una monocapa interfásica en estrecho vínculo con un reservorio de surfactante<sup>10</sup>, lo que sustenta que estas preparaciones de surfactante son poli-dispersas, no obstante su rango de tamaño de partículas varía de una a otra lo cual incide en la viscosidad diferente reportada en ellas<sup>7,11,12</sup>. El análisis del tamaño de partícula a la suspensión de Surfacen® a la cual se le ha adicionado 5% de colesterol muestra un patrón muy similar al obtenido en Surfacen®, con la particularidad de que el último rango se amplió, el cual comprende de 20 a 200 μm (Fig. 3B).

### CONCLUSIÓN

El Surfacen® manifestó una dependencia mínima de la viscosidad en función del gradiente de velocidad de cizalla, con una tendencia a un comportamiento newtoniano evidenciado mejor a 37 que a 23 °C, con una baja viscosidad. Análisis del tamaño y distribución de partículas evidenció que es un sistema poli-disperso. El proceso de liofilización disminuye la viscosidad del producto asimismo la adición del colesterol no afecta el comportamiento reológico de Surfacen®. Estos resultados contribuyen a una mejor caracterización del medicamento Surfacen®. La búsqueda de preparaciones de surfactantes análogos al surfactante endógeno es una prioridad en la investigación del tema, el hecho de presentar Surfacen® una baja viscosidad similar a la informada para el surfactante natural endógeno puede implicar una composición bioquímica más parecida a este, en comparación con otras preparaciones, por otra parte pueda, también, favorecer el proceso de aplicación endotraqueal y por tales razones constituirse en un surfactante de elección.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Goerke, J. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1408**: 9-89.
- Pérez-Gil, J. (2002) *Biol. Neonate* **81**: 6-15.
- Wright, J. R. (1997) *Physiol. Rev.* **77**: 931-62.
- Wright, J.R. (2005) *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 58-68.
- Zhang, J.P., Y.L. Wang, Y.H. Wang, R. Zhang, H. Chen & H.B. Su (2004) *Chin. Med. J. (Engl.)* **117**: 120-4.
- Bernhard W., H.P. Haagsman, T. Tschernig, C.F. Poets, A.D. Postle, M.E. van Eijk & H. von der Hardt (1997) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **17**: 41-50.
- Rüdiger M., A. Tolle, W. Meier & B. Rustow (2005) *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **288**: L379-L83.
- Ramanathan R., M.R. Rasmussen, D.R. Gerstmann, N. Finer & K. Sekar (2004) *Am. J. Perinatol.* **21**:109-19.
- Lam B.C., Y.K. Ng & K.Y. Wong (2005) *Pediatr. Pulmonol.* **39**: 64-9.
- Blanco O. & J. Pérez-Gil (2007) *Eur. J. Pharmacol.* **568**: 1-15.
- Antonova N., R. Todorov & D. Exerowa (2003) *Biorheology* **40**: 531-43.
- King D.M., Z. Wang, J.W. Kendig, H.J. Palmer, B.A. Holm & R.H. Notter (2001) *Chem Phys Lipids* **112**: 11-9.
- King D.M., Z. Wang, H. J. Palmer, B.A. Holm R. & Notter (2002) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**: L277-L84.
- Manzanares D, E. Díaz, W. Alfonso, A. Escobar, H. Colomé, M.C. Muñoz, M. Noa, S. Rabell & A. Hidalgo (1995) República de Cuba Patente A 61 K 35-42.
- Martin A. (1993) *Physical Pharmacy*. 4th Ed., Lea & Febiger, Philadelphia.
- Alonso C. & J. Zasadzinski (2004) *Phys. Rev. E* **69**: 021602-1-6.
- Alonso C, T. Alig, J. Yoon, F. Bringezu, H. Warriner & J. Zasadzinski (2004) *Biophys. J.* **87**: 4188-202.
- Rüstow B, I. Kolleck, F. Guthmann, R. Haupt & P. Stevens (1994) *Biochem. J.* **302**: 665-8.
- Bernardino de la Serna J., J. Perez-Gil, A.C. Simonsen & L.A. Bagatolli (2004) *J. Biol. Chem.* **279**: 40715-22.
- Braun A., P.C. Stenger, H.E. Warriner, J.A. Zasadzinski, K.W. Lu & H.W. Taesch (2007) *Biophys. J.* **93**: 123-39.