

Cinética de Cristalización de Insulina en la Formulación de Inyectables para Uso Terapéutico.

Autores: Dr. Arturo Toledo (1) * Lic. María del C. Muñoz (1)
 Dr. Miguel Bonera (1) Lic. Hilda Rodríguez (1)
 Lic. Nelson Sierra (1) Ing. Daniel Amaro (2)
 Dr. Víctor Trejo (3)

Resumen:

Teniendo en cuenta la importancia del proceso de cristalización de insulina en la formulación de inyectables con efecto retardado, dicho fenómeno es retomado y se actualiza la información vinculada al mismo sobre la base de trabajos experimentales y la aplicación de la modelación matemática. En este sentido se evaluó un modelo fenomenológico con independencia del tamaño de cristales mediante ajuste de los datos experimentales para obtener al mismo tiempo los parámetros cinéticos característicos.

Résumé:

En tenant compte de l'importance du processus de cristallisation de l'insuline dans la formulation des injectables d'effet prolongé, le phénomène est repris et l'actualisation de l'information est développé à partir du travail expérimental et de la modélisation mathématique. Un modèle phénoménologique non dépendant de la taille des cristaux a été essayé par l'ajustement des données expérimentales, dont on obtient en conséquence les paramètres cinétiques de caractérisation.

(1) Dept. Investigaciones y Desarrollo, PLANTA DE INSULINA: Avenida 27A entre 264 y 268; Lista Correo Habana 36, Código Postal 13 600; San Agustín, Municipio La Lisa; Ciudad Habana, CUBA.

(2) Centro de Química Farmacéutica (CQF).

(3) Facultad de Eléctrica, Instituto Superior Politécnico José A. Echevarría (ISPJAE).

* A quien toda correspondencia debe ser dirigida.

Abstract:

Regarding the importance of the insulin crystallization process in protracted effect injectable formulations, the phenomenon is retaken and information updating is developed, based on experimental work and mathematical modelling. A non dependent crystal size phenomenological model was tested by fitting experimental data and consequently obtaining the characteristic kinetical parameters.

Introducción

La caracterización del fenómeno de cristalización referente a cualquier aplicación en particular es una tarea relativamente compleja pero a la vez necesaria, pues dicha práctica sustenta la base imprescindible ya sea para el desarrollo de nuevas tecnologías de producción de este tipo, incluyendo el diseño del equipamiento correspondiente ó el mejoramiento de procesos y equipos tecnológicos ya en existencia.

La práctica común en este sentido conlleva a establecer de forma adecuada las leyes asociadas al fenómeno que representan la cinética de crecimiento de los cristales a través de modelos matemáticos, los cuales deben ser ajustados a los datos experimentales correspondientes con vistas a determinar los parámetros de identificación del modelo seleccionado. Dicho procedimiento semiempírico a su vez facilita la aplicación de criterios de optimización específicos vinculados al desenvolvimiento del proceso de cristalización en cuestión.

Numerosos estudios de cristalización relacionados a una amplia variedad de sustancias orgánicas e inorgánicas han sido reportados en la literatura, los cuales han sido resumidos por Tavare (1987) y al mismo tiempo han sido enriquecidos a partir de las investigaciones desarrolladas en sistemas de mayor complejidad tales como péptidos, polipéptidos y proteínas con relativa importancia en el mundo actual (Grabenbauer y Glatz, 1981; Nelson y Glatz, 1985; Rohani y Chen, 1993).

La insulina pudiera ser considerada como una de las proteínas que ha sido más extensamente estudiada a partir de su obtención por primera vez en forma cristalina realizada por Abel en 1928, sin embargo muy poca información actualizada ó estudios recientes vinculados al

fenómeno de cristalización aparecen reportados en la literatura. En este caso, trabajos de investigación muy importantes fueron desarrollados principalmente por Hallas-Møller (1952), Schlichtkrull (1956a,b) (1957a,b,c,d,e) (1958) y más recientemente por Brange et al (1987) y Feldmeier et al (1991a,b), aunque los mismos no fueron estrictamente fundamentados bajo un enfoque relativo a las operaciones unitarias.

Tal y como ha sido expuesto en trabajos anteriores (Toledo et al, 1995a,b), la cristalización de insulina juega un papel clave en la producción de inyectables de su tipo, que en su mayoría promueven un efecto retardado en la terapia de pacientes diabéticos insulino-dependientes de acuerdo a la distribución de tamaño de cristales y la cantidad de componente cristalino en cada dosis aplicada.

En el presente trabajo se retoma el fenómeno de cristalización de insulina en un primer intento de estimación de los parámetros correspondientes a la cinética de crecimiento de los cristales. Para llevar a cabo dicha tarea, normalmente se emplean técnicas para la obtención de datos cinéticos que requieren de procedimientos y equipamiento especial para el análisis de la distribución de tamaño de partículas relativo a la fase cristalina, además de la determinación de la concentración de soluto del lado de la solución. Dicho equipamiento en la actualidad se caracteriza por su alto costo de adquisición, especialmente en el caso del análisis de proteínas.

Ante ésta limitante se concibió un procedimiento particular para la obtención de los parámetros cinéticos de cristalización partiendo de la variación con el tiempo del tamaño medio de los cristales y dicha información empírica correspondiente a la fase cristalina fue ajustada a la ecuación diferencial no lineal representativa de la tendencia al crecimiento de los cristales determinada sobre la base de determinadas consideraciones deducidas del proceso en específico.

Materiales y Métodos

1. Fundamento teórico

En las preparaciones destinadas al uso farmacéutico de suspensiones cristalinas de insulina, la obtención de cristales monodispersos se desarrolla mediante la introducción de un número predeterminado de

núcleos cristalinos al comienzo del proceso (Schlichtkrull, 1957b), asegurando de ésta forma que los cristales alcancen el tamaño final deseado y a la vez reduciendo al mínimo el fenómeno de nucleación secundaria.

La composición química del medio de cristalización y su procedimiento de preparación fue establecido en principio por Schlichtkrull y Nøring (1957). El pH en el medio es ajustado al punto isoeléctrico (5,45-5,55) y a continuación se inoculan los pequeños núcleos cristalinos comúnmente denominados como semilla ó medio de semillamiento.

En el proceso de cristalización desarrollado sin semillamiento, aproximadamente un 95% de la insulina se precipita inicialmente en forma de agregados y durante la primera hora dicha insulina en estado amorfo se disuelve en la fase solución de forma gradual para posteriormente iniciar el crecimiento de los cristales. La fracción correspondiente a la fase cristalina primero se incrementa rápidamente y más tarde de forma más lenta hasta lograr el estado final de equilibrio. En este instante cerca de un 92% de la insulina presenta forma cristalina, mientras alrededor de un 3% se mantiene en solución y el resto se mantiene en estado amorfo.

Por otro lado, el semillamiento acelera el paso del estado amorfo a solución y luego a la fase cristalina con la evidencia de que prácticamente todo el precipitado amorfo inicial se transfiere a la solución en los primeros 15 minutos, por lo que en este caso las moléculas de insulina se ven favorecidas para alcanzar la estructura cristalina caracterizada por su mayor estabilidad.

Analizando de forma rigurosa el fenómeno, éste debe interpretarse como un proceso dinámico de transferencia de masa que involucra dos etapas sucesivas con interacción descritas a través de un sistema de tres ecuaciones diferenciales no lineales deducidas en correspondencia con cada estado de agregación de la insulina.

Asumiendo que el paso de amorfo a solución es casi instantáneo y despreciando el efecto de nucleación espontánea en el caso del semillamiento, el proceso global de cristalización de insulina puede ser representado mediante una ley de potencia empírica que expresa la deposición de soluto en los núcleos cristalinos de semilla de la siguiente forma:

$$\frac{dW}{dt} = K_G A_T \sigma^g \quad (1)$$

donde 'K_G' y 'g' son los parámetros cinéticos básicos. 'A_T' es el área superficial total de los cristales, la cual se va reduciendo gradualmente a medida que la fase cristalina se va incrementando en volumen, luego es más conveniente expresar la ecuación en función del crecimiento del tamaño medio de los cristales en lugar del flujo másico de deposición:

$$\frac{d\bar{L}}{dt} = k_g \sigma^g \quad (2)$$

donde finalmente 'g' es el orden del crecimiento cinético; 'k_g' es el coeficiente global de crecimiento lineal que en principio depende de la temperatura, condiciones hidrodinámicas como la velocidad de agitación, además de la presencia de impurezas u otras sustancias en el medio y 'sigma' será definido de forma conveniente como la sobresaturación relativa al contenido inicial de insulina en el medio de cristalización antes del semillamiento de la siguiente forma:

$$\sigma = \frac{c - c^*}{c_0} \quad (3)$$

Al mismo tiempo, la cantidad de insulina transferida durante el proceso desde el lado de la solución a la fase cristalina puede ser expresada a través del siguiente balance de material:

$$-V \frac{dc}{dt} = \frac{dW}{dt} \quad (4)$$

donde 'V' es el volumen del medio de cristalización que es asumido como constante. Transformando la ecuación anterior en función de la sobresaturación relativa dada por la ecuación (3) e integrando la misma, se obtiene entonces:

$$\sigma = \sigma_0 - \frac{1}{I} (W - W_0) \quad (5)$$

donde 'sigma₀' es la sobresaturación relativa inicial en el medio de cristalización e 'I = C₀ V' representa la cantidad inicial de insulina en el medio.

Asumiendo que el factor de forma de los cristales es constante durante la cristalización posterior al semillamiento, el crecimiento másico del componente cristalino puede ser expresado en términos del tamaño medio 'L-' a través de la relación:

$$W = W_0 (\bar{L} / \bar{L}_0)^3 \quad (6)$$

donde 'W₀' y 'L₀' representan la masa de núcleos de semillamiento y su tamaño medio respectivamente.

Combinando las ecuaciones (5) y (6) es posible obtener la relación entre el tamaño medio de los cristales y la sobresaturación relativa de la siguiente forma:

$$\sigma = \sigma_0 - \frac{W_0}{I} \left[(\bar{L} / \bar{L}_0)^3 - 1 \right] \quad (7)$$

y sustituyendo ésta en la ecuación (2) se obtiene finalmente:

$$\frac{d\bar{L}}{dt} = k_g \left(\sigma_0 - \frac{W_0}{I} \left[(\bar{L} / \bar{L}_0)^3 - 1 \right] \right)^g \quad (8)$$

la cual es una ecuación diferencial ordinaria no lineal que describe la dinámica de crecimiento del tamaño medio de los cristales durante el proceso de cristalización.

2. Ajuste de los datos experimentales.

Con el propósito de evaluar la validez del modelo matemático y al mismo tiempo obtener los parámetros cinéticos característicos 'kg' y 'g', se concibió un procedimiento para el ajuste de la ecuación (8) a la información obtenida de la variación del tamaño medio de los cristales 'L' respecto al tiempo en los diferentes ensayos experimentales. Dicho procedimiento se ilustra de forma esquemática en la fig. 1.

La ecuación diferencial ordinaria no lineal que representa el proceso de cristalización es resuelta para los parámetros cinéticos obtenidos en iteraciones sucesivas como resultado de la aplicación de un método de optimización por búsqueda automática, a través del cual se va ejecutando la minimización de las desviaciones de los datos experimentales "e" respecto a los valores teóricos correspondientes a lo largo del tiempo de duración de la corrida "T_f", utilizando el siguiente criterio como función objetivo (F.O.) a minimizar:

$$F.O. = \frac{1}{T_f} \int_0^{T_f} e^2 dt \quad (9)$$

La combinación de ambas técnicas numéricas se llevó a cabo simultáneamente utilizando como soporte computacional el sistema MATHLAB Versión 4.2.

3. Trabajo experimental.

Se desarrolló un primer conjunto de ensayos de cristalización de insulina a partir de la inoculación de volúmenes predeterminados de núcleos de semilla obtenidos mediante dos procedimientos diferentes descritos por Schlichtkrull y Nøring (1958). En este caso se utilizaron tres preparaciones de semilla cuyas distribuciones de tamaño de los núcleos fueron identificadas con tamaños medios de 10; 6,8 y 2,2 micras en cada caso.

Un segundo conjunto de experimentos se llevó a cabo en tanto que fue seleccionado entre ambos procedimientos de obtención de semilla aquel que aseguraba un tamaño medio de los núcleos entre 1...2 micras (Schlichtkrull, 1957b). En tal caso se obtuvieron otros tres preparados de semilla con distribuciones de tamaño entre 1...1,5 micras para el desarrollo de dichos experimentos de cristalización.

En todos los experimentos se preparó el medio de cristalización con un contenido de 1% p/v de insulina de origen porcino altamente purificada, 7% p/v de NaCl, entre 8...9 mg de Zn²⁺ por gramo de insulina para asegurar una proporción de 4 Zn²⁺/hexámero de insulina; 0,1 M de acetato de sodio trihidratado y suficiente NaOH en concentración 2N para ajustar el pH del medio entre 5,45...5,5 correspondiente al punto isoeléctrico de la insulina. La insulina utilizada fue suministrada y a la vez certificada por DIOSYNTH. El resto de las sustancias fueron suministradas y a la vez certificadas por BDH como reactivos para uso analítico. Las mediciones de pH se llevaron a cabo mediante un pHmetro digital RADIOMETER con apreciación de ±0,01.

Una vez preparado el medio de cristalización, se introdujo en cada caso una cantidad de semilla predeterminada de acuerdo al procedimiento descrito por Schlichtkrull y Nøring (1957) y Brange et al (1987). Durante el proceso de cristalización se tomaron muestras a intervalos de tiempo específicos para determinar la distribución de tamaño de cristales a través de un microscopio óptico OLYMPUS BH-2. En tal sentido se empleó una técnica de conteo, una vez que se verificada la precisión y la repetibilidad del dispositivo, en la cual debían contarse y medirse más de 100 cuerpos cristalinos aislados en una cámara FÜCHS para determinar el porcentaje numérico de distribución acumulativo y diferencial en cada muestra. Al mismo tiempo, el tamaño medio fue determinado a través del cociente entre el primer momento M₁ y el momento cero M₀ para cada distribución de la siguiente forma:

$$\bar{L} = \frac{M_1}{M_0} = \frac{\int_{L_{min}}^{L_{max}} nL dL}{\int_{L_{min}}^{L_{max}} n dL} \quad (10)$$

Discusión de resultados

En las fig. 2 y 3 se ilustra de forma gráfica el ajuste del modelo matemático propuesto a los datos experimentales obtenidos en las diferentes corridas realizadas. De igual forma en la tabla I se muestran los parámetros cinéticos correspondientes producto de los ajustes realizados, así como el índice de la calidad de los ajustes expresado numéricamente por el propio criterio de optimización (F.O.).

En todos los casos se observa que el modelo teórico reproduce en buena medida las tendencias de crecimiento de los cristales con un mayor o menor grado de calidad en el ajuste, lo cual está dado fundamentalmente por los errores inherentes a cualquier medición experimental.

En el primer grupo de experimentos se evidencia que a medida que se emplean tamaños medios de semilla más pequeños el coeficiente de orden cinético 'g' se incrementa en magnitud, lo cual es consecuencia del aumento considerable del área superficial específica de los núcleos de semilla en relación inversa al tamaño de los mismos, por lo que de acuerdo a la ecuación (1) la transferencia de masa hacia los núcleos se ve favorecida y en tal caso el proceso de cristalización se verifica de forma más rápida.

De igual forma se observa una influencia similar sobre el coeficiente global de crecimiento 'k_g', aun cuando todas las experiencias se realizaron a temperatura ambiente de 20° C y agitación constante de 85 rpm. No obstante, las condiciones hidrodinámicas en el medio de cristalización parecen también ser favorecidas con la disminución del tamaño medio de los núcleos cristalinos dado que la cantidad de núcleos a inocular para obtener el mismo tamaño al final es menor, aunque tampoco se descarta una posible relación con el tamaño y la forma de los cristales, la cual durante las mediciones realizadas en el microscopio se detectó que es predominantemente romboédrica.

En los experimentos 3, 4, 5 y 6, donde se utilizaron tamaños de semilla entre 1 y 2,2 micras se determinó un mismo valor para el coeficiente global de crecimiento de 65,0 y un coeficiente de orden cinético promedio de 13,08 con una desviación standard de $\pm 1,80$; muy por encima de los valores normalmente reportados en la literatura para otras sustancias que generalmente se encuentran en un rango entre 0

y 2,5; por lo que se evidencia que para las condiciones en que normalmente se desarrolla la obtención del componente cristalino en las formulaciones de insulina tipo LENTARD y sobre las cuales se basaron estos experimentos, el proceso de cristalización se verifica de manera bastante rápida.

No obstante en los experimentos 5 y 6 el crecimiento de los cristales fue insuficiente para satisfacer plenamente el rango de tamaño de cristales establecido entre 10 y 40 micras para este tipo de formulación, lo cual puede haber sido producto de que se hayan dado condiciones favorables para el desarrollo de una nucleación secundaria en estos experimentos en particular.

Conclusiones

Como resultado final del trabajo se demostró que el modelo matemático propuesto basado en la ley de MacCabe de crecimiento lineal con independencia del tamaño de partículas y con las consideraciones realizadas de antemano, reproduce en buena medida el proceso de cristalización de insulina que normalmente se lleva a cabo en la obtención del componente cristalino para formulaciones de Insulina-Zn de efecto retardado, el cual se verifica de manera relativamente rápida en comparación con otros procesos de cristalización conocidos para otras sustancias orgánicas e inorgánicas de menor complejidad.

No obstante, se recomienda para futuros trabajos la evaluación de otros modelos matemáticos similares que incluyan la influencia del tamaño de cristales sobre la velocidad de crecimiento así como la velocidad de nucleación bajo las mismas condiciones experimentales.

TABLA 1: PARAMETROS CINETICOS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS AJUSTES EFECTUADOS

EXPERIMENTO	COEFICIENTE 'k _g ' (μm/h)	ORDEN CINETICO 'g'	INDICE DEL AJUSTE
1	8,5	1,7	6,23
2	11,0	3,5	0,4
3	65,0	10,6	0,7
4	65,0	12,9	10,3
5	65,0	14,5	6,7
6	65,0	14,3	2,0

Nomenclatura

AT:	Area Superficial Total de Cristales (m^2)
c:	Concentración de Insulina en el Medio (g/mL)
c*:	Concentración de Insulina en Condiciones de Equilibrio (g/mL)
c ₀ :	Concentración Inicial de Insulina en el Medio (g/mL)
e:	Desviación de Tamaño de Cristales Relativo a su Valor Teórico (μm)
g:	Coefficiente de Orden Cinético
l:	Masa de Insulina Inicialmente en el Medio (g)
k _g :	Coefficiente Global de Crecimiento Lineal ($\mu m/h$)
K _G :	Coefficiente Global de Transferencia de Masa ($g/m^2.h$)
L:	Tamaño de Cristales (μm)
L ⁻ :	Tamaño Medio de Cristales (μm)
L ₀ :	Tamaño Medio de Semilla (μm)
L _{min} :	Tamaño Mínimo en la Distribución (μm)
L _{max} :	Tamaño Máximo en la Distribución (μm)
M ₀ :	Momento "0" de la Distribución Diferencial
M ₁ :	Primer Momento de la Distribución Diferencial
n:	Densidad Poblacional de Cristales (No./ $\mu m..mL$)
t:	Tiempo (h)
T _f :	Tiempo de Duración de Corrida (h)
V:	Volumen del Medio (mL)
W:	Masa de Cristales (g)
W ₀ :	Masa de Núcleos de Semilla (g)

SIMBOLOS GRIEGOS:

sigma:	Sobresaturación Relativa a la Masa Inicial de Insulina en el Medio
sigma ₀ :	Sobresaturación Relativa Inicial en el Medio

BIBLIOGRAFIA

1. Brange, J. et al. 'Galénics of Insulin. The Physico-Chemical and Pharmaceutical Aspects of Insulin and Insulin Preparations', Springer-Verlag Publisher, Berlin Heidelberg, pp 17-12 (1987)
2. Feldmeier, H.G. et al. 'Untersuchungen zum Kristallisationsverhalten von Chromatographisch Gereinigtem Schweineinsulin', *Pharmazie* 46, 579 - 582 (1991a)
3. Feldmeier, H.G. et al. 'Quantitative Bestimmung des Kristallinen Insulins in Insulin-Zink-Suspensionen als Inprozeß-Kontrolle', *Pharmazie* 46, 517 - 519 (1991b)
4. Grabenbauer, G.C. y C.E. Glatz 'Protein Precipitation Analysis of Particle Size Distribution and Kinetics', *Chem. Eng. Comm.* 12, 103 - 119 (1981)
5. Hallas-Møller, K. et al. 'Crystalline and Amorphous Insulin-Zinc Compounds with Prolongued Action', *Science* 116, 394 - 399 (1952)
6. Nelson, C.D. y C.E. Glatz 'Primary Particle Formation in Protein precipitation', *Biotech. Bioeng.* 27, 1434 - 1444 (1985)
7. Rohani, S. y M. Chen 'Aggregation and Precipitation Kinetics of Canola Protein by Isoelectric Precipitation', *Can. J. Chem. Eng.* 71, 689 - 698 (1993)
8. Schlichtkrull, J. 'Insulin Crystals I. The Minimum Mole-Fraction of Metal in Insulin Crystals Prepared with Zn²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, or Fe²⁺', *Acta Chem. Scand.* 10, 1455 - 1458 (1956a)
9. Schlichtkrull, J. 'Insulin Crystals II. Shape of Rhombohedral Zinc-Insulin Crystals in relation to Species and Crystallisation Media', *Acta Chem. Scand.* 10, 1459 - 1464 (1956b)
10. Schlichtkrull, J. 'Insulin Crystals III. Determination for the Rhombohedral Zinc-Insulin Cell by Combined Microscopical and Chemical Examinations', *Acta Chem. Scand.* 11, 291 - 298 (1957a)

11. Schlichtkrull, J. 'Insulin Crystals IV. The Preparation of Nuclei, Seeds and Monodisperse Insulin Crystals Suspensions', *Acta Chem. Scand.* 11, 299 - 302 (1957b)
12. Schlichtkrull, J. 'Insulin Crystals V. The Nucleation and Growth of Insulin Crystals', *Acta Chem. Scand.* 11, 439 - 460 (1957c)
13. Schlichtkrull, J. 'Insulin Crystals VI. The Anisotropic Growth of Insulin Crystals', *Acta Chem. Scand.* 11, 484 - 486 (1957d)
14. Schlichtkrull, J. 'Insulin Crystals VII. The Growth of Insulin Crystals', *Acta Chem. Scand.* 11, 1248 - 1256 (1957e)
15. Schlichtkrull, J. y I.M. Nøring 'Process of Producing Insulin Crystals of Substantially Uniform Size and Composition Thereof', US Patent No. 2,799,622 (1957)
16. Schlichtkrull, J. y I.M. Nøring 'Process for Crystallization of Insulin Using Freeze Dried Insulin as Seeding Material', US Patent No. 2,819,999 (1958)
17. Schlichtkrull, J. 'Insulin Crystals. Chemical and Biological Studies on Insulin Crystals and Insulin-Zinc Suspensions', Thesis, first edn. Ejnar Munksgaard Publisher, Copenhagen pp 17 - 71 (1958)
18. Tavaré, N.S. 'Batch Crystallizers: a Review', *Chem. Eng. Comm.* 61, 259- 318 (1987)
19. Toledo, A. et al. 'Cristalización de Insulina: Importancia del Semillamiento en la Calidad del Producto Final', *Rev. Cubana Farm.* 29, 12 - 16 (1995a)
20. Toledo, A. et al. 'Cristalización de Insulina: Factores que Influyen en la Cinética de Crecimiento', *Rev. Cubana Farm.* 29, 17 - 21 (1995a)

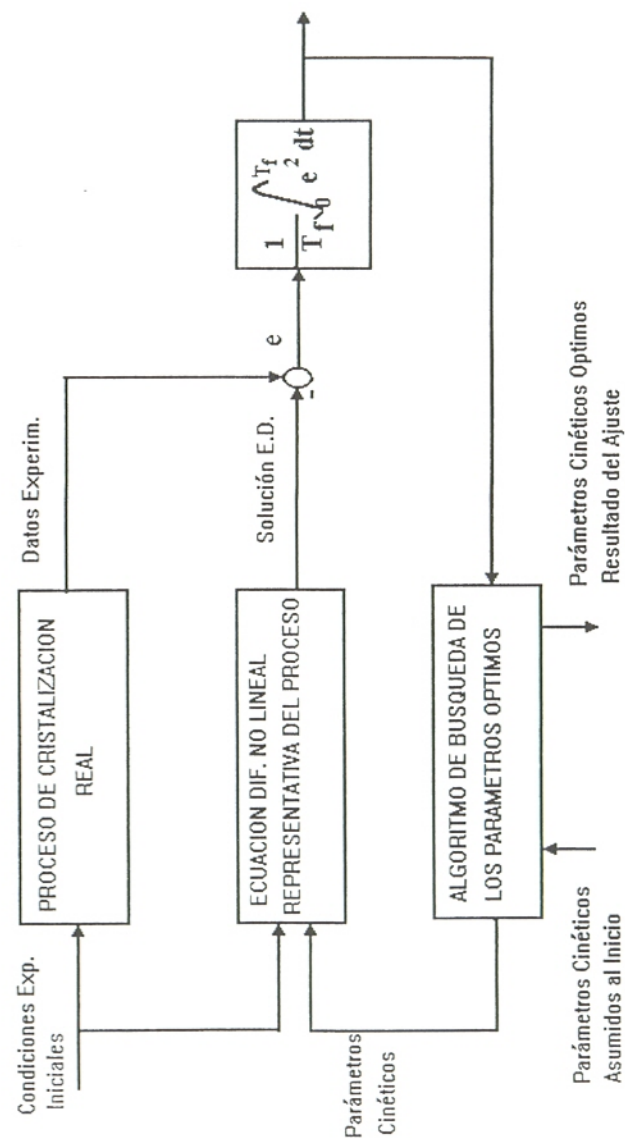


Fig. 1 PROCEDIMIENTO DE AJUSTE DE DATOS EXPERIMENTALES

Fig.2 Primer Grupo de Experimentos Partiendo de Diferentes Tamaños de Semilla

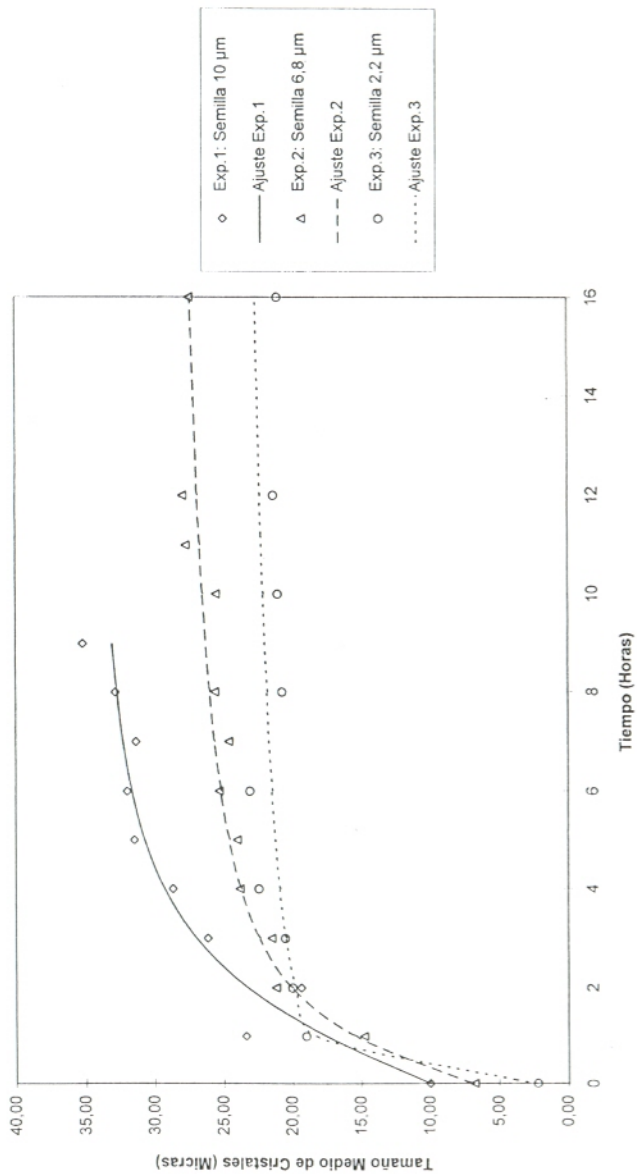


Fig.3 Segundo Grupo de Experimentos Partiendo de Tamaños de Semilla Similares

