

ESTUDIO IONTOFORÉTICO DEL CIDOFOVIR A TRAVÉS DE PIEL PRETRATADA CON SUSTANCIAS PROMOTORAS DE LA ABSORCIÓN

A. Monfort, S. Santoyo, M. Arrondo, R. Martínez, P. Ygartua

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, 31080 Pamplona, España.

Introducción

El cidofovir es un nucleótido monofosfatado análogo de la citosina con una potente actividad antiviral "in vivo" e "in vitro" frente a un amplio espectro de herpes virus humanos como el virus del herpes simple tipo 1 y 2. El cidofovir penetra en las células por endocitosis y para ser activo debe sufrir dos fosforilaciones consecutivas. A diferencia de otros antivirales, su fosforilación y por tanto su activación, no depende de la presencia de enzimas virales, sino que es catalizada por vía celular[1].

Las formas farmacéuticas tópicas convencionales existentes con otros antivirales, presentan una serie de limitaciones que hacen que disminuya la eficacia óptima del fármaco y sólo se alcanza una cantidad mínima de principio activo en la epidermis basal, lugar de localización del herpes virus.

La iontoforesis es una técnica no invasiva que está siendo estudiada para terapia local y sistémica. Se ha definido como un método físico de transferencia de fármacos ionizados a través de una membrana, como puede ser la piel, con aplicación de una corriente eléctrica [2].

El objeto de este estudio ha sido modificar la absorción del cidofovir y para ello, hemos empleado como vehículo un gel hidrofílico de carbopol, la piel ha sido tratada con terpenos, ácido oleico y etanol, y la absorción percutánea potenciada con la iontoforesis.

Materiales y Métodos

Materiales.

El cidofovir es suministrado por Gilead Sciences (Foster City, C.A. USA). Los coadyuvantes

empleados en la elaboración del gel hidrofílico son: el propilenglicol USP (Roig Farma S.A.), el carbopol ETD 2020 (BF Foodrich), la trietanolamina 85% (Roig Farma S.A.) y el agua destilada, proporcionada por el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Como promotores de la absorción, se han usado el timol (Genay, France), el ácido oleico (Merck eurolab), el eucalyptol (Fluka Switzerland) y el etanol (Merck eurolab) en solución reguladora de pH 5,5. La solución reguladora a pH 5,5, se prepara con hepes (Sigma), cloruro sódico (Roig Farma, S.A.), agua destilada e hidróxido sódico (Prolabo).

Métodos.

Elaboración del gel: para la preparación de la formulación, se añade 1g de cidofovir sobre la mezcla de agua destilada (c.s.p.50g)/propilenglicol (5g); a continuación se dispersa el carbopol (500mg) y se mantiene bajo agitación aproximadamente 12h, hasta completa homogeneización. Finalmente, se neutraliza con trietanolamina 85% hasta pH 6, que conlleva la formación del gel que dejaremos reposar al menos 24h antes de su utilización.

Pretratamiento de la piel: para llevar a cabo los pretratamientos de la piel, se prepararon soluciones al 5% con los diferentes promotores en etanol/solución reguladora (50:45) a pH 5,5.

Estudios de absorción percutánea: para llevar a cabo los estudios de absorción, una vez dermatomizada (Aesculap GA 630) la piel de oreja de cerdo a 1,2 mm, se coloca entre el compartimento dador y receptor de

la celda iontoforética. Sobre la piel, dentro del compartimento dador y en el lado que constituirá el cátodo, 1,3g de nuestra formulación, ya que el cidofovir está cargado negativamente a pH 6, y por tanto llevaremos a cabo una iontoforesis catódica. Tanto en el ánodo como el compartimento receptor contienen solución tampón a pH 5,5. A todo este sistema, se le aplica una corriente de 0.28 mA/cm² (APH 1000H, Kepco, Inc.), y por acción de una bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3), se van recogiendo muestras de 1.5 ml en los receptores del colector (Gilson FC 203B) cada 60 min, a lo largo de 7h. La cantidad de cidofovir presente en los tubos receptores se determina por HPLC-UV a 274 nm [4].

Extracción del fármaco retenido en piel: tras las 7h de experiencia, se lava la piel con agua destilada y se congela embebida en un crioprotector (tissue-tek, O.C.T.) para llevar a cabo los cortes horizontales a 30 µm en criostato (Leica CM 1900) a -25° C. Para extraer el fármaco, se adiciona a los cortes 300 µl de agua destilada, se calientan en el baño entre 60-70°C durante 15 min y finalmente se centrifugan 10 min a 8000rpm. Se filtran y se cuantifica el cidofovir retenido en cada estrato por HPLC-UV a 274 nm.

Resultados y Discusión

La iontoforesis se ha descrito en numerosos artículos como un método físico efectivo para mejorar la absorción percutánea de diversos fármacos [3], respecto de su difusión pasiva. Si además se llevan a cabo pretratamientos de la piel previos a la aplicación de la técnica iontoforética, esta absorción aumenta aún más. En nuestros estudios y en concordancia con otros autores, los mejores valores de flujo iontoforético se obtienen cuando se utiliza como promotor el eucalyptol 5% y el ácido oleico 5% (Fig.1). Los resultados muestran una tendencia similar cuando la piel se pretrata con cualquiera de ellos, aunque los valores máximos se alcanzan a las 3h con el terpeno y a las 4h con el ácido. En el caso del timol 5% y el etanol 50%, la absorción va aumentando lentamente a lo largo de las 7h de experimentación.

El pretratamiento durante 2h con eucalyptol 5%, timol 5% y etanol 50%, también mejora el flujo pasivo, sin observarse grandes diferencias entre una sustancia u otra (Fig 2). Los máximos se observan a las 3h para el pretratamiento con timol 5% o con eucalyptol 5%, seguido de una tendencia descendente durante la cuarta y quinta hora.

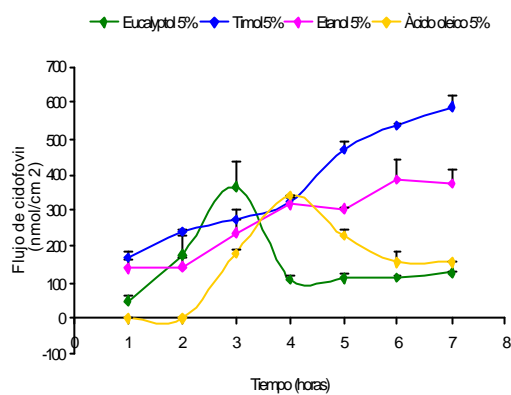


Fig 1. Perfiles de absorción iontoforética del cidofovir tras un pretratamiento de la piel con ácido oleico 5%, eucalyptol 5%, timol 5% y etanol 50%.

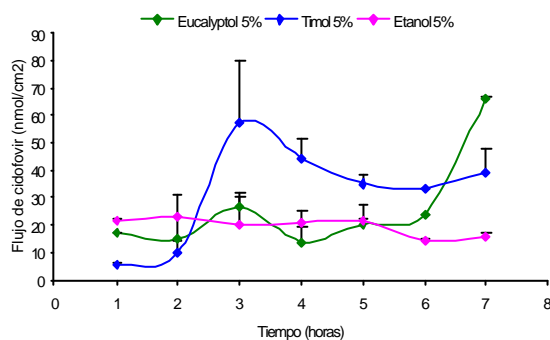


Fig 2 Perfiles de absorción pasiva del cidofovir tras un pretratamiento de la piel con eucalyptol 5%, timol 5% y etanol 50%.

Respecto del cidofovir retenido en piel, generalmente la cantidad detectada en los diferentes estratos, disminuye al aumentar la profundidad de cortes. En la superficie de la piel, hasta 180 µm, ha sido encontrada la mayor concentración de fármaco. Sin embargo, el pretratamiento de la piel con terpenos al 5%, etanol 50% o ácido oleico 5% y la posterior

aplicación de la iontoforesis, también ha permitido detectar cantidades de fármaco apreciables a 400µm de profundidad (Fig 3). Este hecho, en el caso del cidofovir presenta una especial relevancia ya que a esta profundidad se considera el lugar de inserción de los herpes virus tipo 1 y 2, frente a los que nuestro fármaco presenta su mayor actividad. La difusión pasiva realizada con piel pretratada con cualquiera de los promotores objeto de estudio, también puso de manifiesto la presencia de cidofovir a esta profundidad pero en cantidades mucho menores (Fig 4).

Cuando el pretratamiento se realiza con etanol 50%, se observa que en los cortes de piel más superficiales, la concentración de fármaco es mayor por difusión pasiva que por iontoforesis, hecho que se invierte burscamente en las capas sucesivas. Esto se debe a una saturación de la membrana y en este momento, la iontoforesis influye de forma decisiva aumentando tanto el flujo del fármaco, como su penetración hacia capas más profundas de la piel.

Los estudios de difusión pasiva con ácido oleico como promotor se realizarán próximamente en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Navarra.

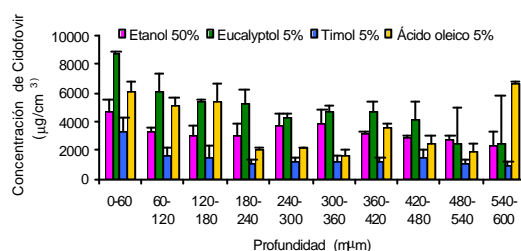


Figura 3. Concentración de cidofovir retenido por cm³ de piel pretratada con ácido oleico 5%, eucalyptol 5%, timol 5% y etanol 50% tras 7h de absorción iontoforética. Cada columna representa el valor medio ± D.S. para n=3.

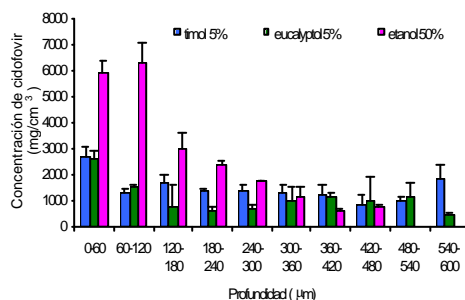


Figura 4. Concentración de cidofovir retenido por cm³ de piel pretratada con eucalyptol 5%, timol 5% y etanol 50% tras 7h de absorción pasiva. Cada columna representa el valor medio ± D.S. para n=3.

Bibliografía

1. Hitchcock, M.J.M., Jaffe, H.S., Martín J.C., et al. "Cidofovir a new agent with potent antiherpesvirus activity". *Antiviral Chem Chemother* (1996); 7: 115-127.
2. Guy, R.H., Kalia, Y.N., Delgado-Charro, M.B., Merino, V. López, A., Marro, D. "Iontophoresis: electrorepulsion an electroósmosis. *J. Control. Release.* (2000); 64: 129-132.
3. Chang, S.L., Hoffmann, G.A., Zhang, L., Deftos, L.J., Banga, A.K. "Transdermal iontophoretic delivery of salmon calcitonin". *Int. J. Pharm.* (2000); 200: 107-113.
4. Santoyo, S., Jalón, E.G., Campanero, M.A., Ygartua, P. "Determination of cidofovir in both skin layers and percutaneous penetration samples by HPLC". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* (2002) 29: 819-826.

Autor de contacto:

Dra. Pilar Ygartua Ayerra

Email: pygartua@unav.es

Institución: Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra

Dirección: Irunlarrea s/n

Ciudad : 31008 Pamplona

Tlf: 948.425600; Fax: 948.425649