

## CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA DE LIPOSOMAS MULTILAMINARES PORTADORES DE ACETÓNIDO DE TRIAMCINOLONA

Beatriz Clares Naveros y M<sup>a</sup> del Mar Medina Pérez

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada

### Introducción

El objetivo de la inclusión de fármacos de uso tópico en liposomas, es incrementar su efectividad biológica en el tratamiento de diferentes enfermedades de la piel. Se ha comprobado como la liberación dérmica controlada de corticoesteroides mediante liposomas determina un incremento de los efectos farmacológicos, mientras que los secundarios resultan hasta cinco veces menores que con formulaciones convencionales (Cevc y cols., 1997; Mezei y cols., 1982) (1,2).

En este sentido, se vienen realizando investigaciones en nuestro laboratorio con el fin de intentar mejorar la biodisponibilidad del acetónido de triamcinolona, mediante su encapsulación en liposomas multilaminares, y facilitar la penetración a través de las barreras anatomofisiológicas, prolongando la dosis efectiva del mismo en la biofase (dermis y epidermis).

Una vez normalizado el método de elaboración de dichos vectores y evaluado el grado de captación del fármaco seleccionado, en función de la composición de los liposomas, el objeto fundamental del presente trabajo es la caracterización de las formulaciones liposomiales mediante microscopía de transmisión electrónica. Dicha caracterización tiene como finalidad conocer con precisión el tipo de estructura obtenido, su composición, tamaño, homogeneidad y estabilidad.

### Material y Métodos

Los liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona (AT) han sido obtenidos por el método de Bangham y cols. (1974)(3), intentándose normalizar las condiciones bajo las cuales se ha llevado a cabo. Como componentes de las formulaciones, que serán la base de la matriz lipídica, se eligieron L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (PC) de huevo fresco, y colesterol (CH), en diferentes proporciones molares (Tablas I y II).

**Tabla I.** Composición de las formulaciones (F) de liposomas elaboradas con fosfatidilcolina.

F Nº	PROPORCION MOLAR PC: AT	mg/ 100ml	
		PC	AT
1	1 : 1	181.15	100.0
2	2 : 1	362.30	100.0
3	3 : 1	543.45	100.0

PC: Fosfatidilcolina

AT: Acetónido de Triamcinolona

**Tabla II.** Composición de las formulaciones (F) de liposomas elaboradas con fosfatidilcolina y colesterol.

F Nº	PROPORCION MOLAR PC: CH: AT	mg/ 100ml		
		PC	CH	AT
4	1 : 0.5 : 1	181.15	44.46	100.0
5	2 : 1 : 1	362.30	88.92	100.0
6	3 : 1.5 : 1	543.45	133.3	100.0

PC: Fosfatidilcolina

AT: Acetónido de Triamcinolona

CH: Colesterol

## 32 VI Congreso SEFIG y 3<sup>as</sup> Jornadas TF

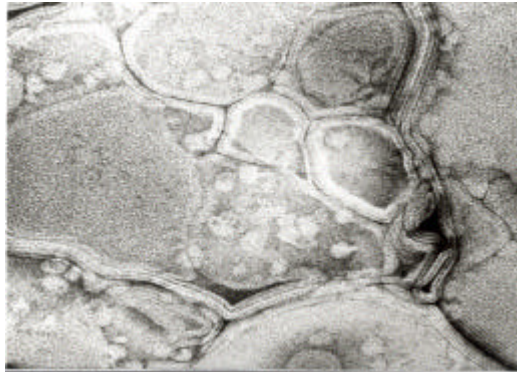
El método seguido consiste en solubilizar los componentes lipídicos en un disolvente orgánico y proceder a su evaporación a vacío y a 37°C. La película lipídica resultante es hidratada con la fase acuosa del sistema, resultando una suspensión de liposomas multilaminares. El acetónido de triamcinolona, dada su solubilidad se localizará en la matriz lipídica de los liposomas. La separación del principio activo encapsulado, del resto de sustancia activa libre situada en la fase acuosa externa que rodea a los liposomas, se efectuó por centrifugación durante 10 minutos a 1000 rpm.

La valoración de las fracciones se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS, a la longitud de onda de 239 nm, máximo de absorbancia para el fármaco en solución etanólica.

Los liposomas se han caracterizado por tinción negativa de las preparaciones con acetato de uranilo en solución al 2% y posterior visualización por microscopía de transmisión electrónica. Se ha observado la estructura y se han evaluado las dimensiones de las seis formulaciones de liposomas objeto de estudio, tres de ellas con fosfatidilcolina y las tres restantes con dicho lípido y colesterol, en las proporciones ya indicadas. Para la caracterización se toman liposomas elaborados en las 24 horas precedentes. Se han caracterizado en función del tiempo, a intervalos de 30 días, hasta los 2 meses desde su preparación, con objeto de apreciar la incidencia del paso del tiempo en las vesículas lipídicas.

### Resultados y discusión

La técnica seleccionada para la caracterización de liposomas multilaminares (MLV) portadores de acetónido de triamcinolona (AT) ha permitido constatar la formación de vesículas lipídicas plurilaminares, denotando la eficacia del método de elaboración empleado ( Figura 1).



**Figura 1** Suspensión de liposomas constituidos por PC:AT (1:1) fotografiada a 140000 aumentos a las 24 horas de la elaboración

En la figura se visualizan las bicapas fosfolipídicas alternando con compartimentos acuosos, así como una zona central polar.

Los valores medios de tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ) evaluados para las seis formulaciones ensayadas, acompañados de sus respectivas desviaciones estándar figuran en la tabla III y IV. Los diámetros han sido determinados, en el momento de la elaboración y transcurridos 30 y 60 días de la misma, al objeto de comprobar la influencia del paso del tiempo en las dimensiones de estos vectores. El número de medidas efectuadas han sido de 100 por fórmula, y periodo de tiempo. Las muestras se han conservado a temperatura de refrigeración (4-6°C) y protegidas de la luz hasta el momento de la caracterización.

**Tabla III.** Valores medios del tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ) para las fórmulas sin colesterol

F	1	2	3
Tiempo			
0	0.45±0.13	0.19±0.17	0.6±0.17
30	0.48±0.17	0.24±0.26	0.99±0.35
60	0.35±0.14	0.25±0.04	0.57±0.27

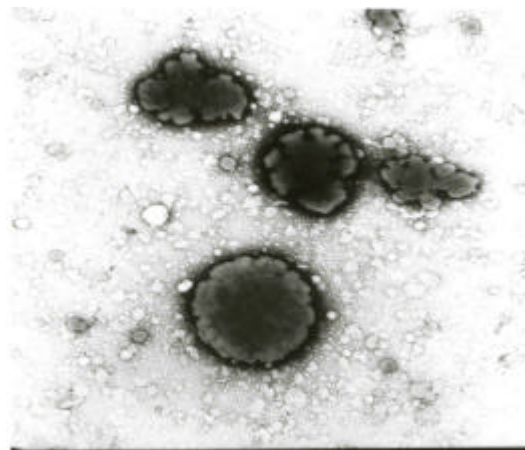
**Tabla IV.** Valores medios del tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ) para las fórmulas con colesterol

F	4	5	6
<b>Tiempo</b>			
<b>0</b>	0.42 $\pm$ 0.31	0.57 $\pm$ 0.13	0.46 $\pm$ 0.08
<b>30</b>	0.46 $\pm$ 0.14	0.77 $\pm$ 0.31	0.69 $\pm$ 0.14
<b>60</b>	0.17 $\pm$ 0.06	0.23 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.14

Como se aprecia en los datos incluidos estos transportadores poseen un tamaño medio inferior a  $1\mu\text{m}$ .

Se ha comprobado como el diámetro medio de liposomas individualizados varía con el paso del tiempo. A los 30 días de su elaboración se produce un aumento del tamaño en todas las fórmulas.

Igualmente los resultados ponen de manifiesto la influencia de la composición de los liposomas, en sus dimensiones. Así, transcurridos los 60 días de estudio, aquellos liposomas que no incluyen colesterol en su matriz lipídica presentan un tamaño elevado, aproximadamente igual al inicial, frente a las fórmulas con colesterol con tamaños menores a los que presentaban recién elaborados. Este fenómeno probablemente sea debido a la presencia del colesterol, que provoca un creciente empaquetamiento entre las regiones polar e hidrófoba por disminución en la hidratación de la bicapa (Filipek y cols., 2001)(4), lo que impide que las vesículas sigan creciendo, manteniendo una membrana fluida, lo que evita la formación de poros, como se observa en la figura 2 (fórmula 2), y por tanto la fuga del acetónido de triamcinolona.



**Figura 2** Suspensión de liposomas constituidos por PC:AT (1:1) fotografiada a los 60 días de la elaboración

Aparte de tamaño de partícula más reducido, las fórmulas con colesterol se caracterizan por presentar un menor índice de rotura y un contorno más liso.

Los datos de caracterización junto con los tamaños sugieren que tras dos meses de almacenamiento, los liposomas empiezan a perder su integridad física. No obstante, estos fenómenos se reducen con la incorporación de colesterol el cual favorece la retención de acetónido de triamcinolona.

### Bibliografía

1. CEVC, G., BLUME, G. y SCHATZLEIN, A. Transfersomers mediated Transepidermal Delivery Improves the Regio-Specificity and Biological-Activity of Corticosteroids in-Vivo. Journal of controlled release, 45, 211-226 (1997).
2. MEZEI, M. y GULASEKHARAM, V. Liposomes, a Selective Drug Delivery System for the Topical Route of Administration. II, Gel Dosage form. J. Pharm. Pharmacol., 34, 473-474 (1982).
3. BANGHAM, A. D. HILL M.W. y MILLER N.G.A. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes In " Methods in membrane biology ", publié par Korn E.D. Plenum Press, New York, 1,1-68 ( 1974 ).
4. FILIPEK, J., UHRIKOVA, D., SLOSARCIK, P. y BALGAVY, P. Effect of cholesterol on egg yolk phosphatidylcholine peroxidation in multilamellar liposomes. Pharmazie 56(12):953-957 (2001).

### **34 VI Congreso SEFIG y 3<sup>as</sup> Jornadas TF**

*Autor de contacto*

*M<sup>a</sup> del Mar Medina Pérez y Beatriz Clares*

*mdelmar@ugr.es*

*Departamento de Farmacia y Tecnología  
Farmacéutica. Facultad de Farmacia.*

*Campus Universitario de la Cartuja s/n, Ciudad:*

*18071- Granada*

*Tel: 958-243900/01*

*Fax: 958-248958*