

## ENCAPSULACIÓN DE AMICACINA EN ERITROCITOS UTILIZANDO UN MÉTODO DE DIÁLISIS HIPOOSMÓTICA

*Carmen Gutiérrez Millán, Francisco González López, Aránzazu Zarzuelo Castañeda, María Luisa Sayalero Marinero, José Martínez Lanao.*

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca  
Dirección: Avda Campo Charro s/n (Campus Unamuno), 37007 Salamanca*

### Introducción

El incremento de la selectividad de los fármacos mejorando su acceso y distribución en aquellos órganos y tejidos responsables de la acción farmacológica con reducción en la incidencia de efectos secundarios, constituye un objetivo fundamental en la optimización de la terapéutica de ciertos grupos de fármacos como los antibióticos.

La utilización de sistemas portadores para el incremento de la selectividad, se basa habitualmente en sistemas de tipo microesferas, liposomas, etc., siendo menos frecuente la utilización de portadores biológicos celulares (1). El objetivo de este trabajo es desarrollar y evaluar eritrocitos como sistemas portadores de Amicacina. Con este tipo de vectores se persigue optimizar el comportamiento farmacocinético de este antibiótico para conseguir un incremento en la selectividad de la distribución al sistema retículo-endotelial así como una reducción de la potencial nefrotoxicidad de este fármaco, sin comprometer su eficacia terapéutica.

### Materiales y Métodos

La preparación de eritrocitos conteniendo Amicacina se realiza utilizando una técnica de diálisis hipoosmótica, previo aislamiento de los eritrocitos a partir de sangre de ratas Wistar.

#### Curva de hemólisis

Se ha estudiado el porcentaje de hemólisis de los eritrocitos frente a la osmolalidad del tampón con el fin de establecer el intervalo óptimo de osmolalidad que contribuya a un mayor

rendimiento en la encapsulación del fármaco con una mínima hemólisis de los eritrocitos.

#### Preparación de los eritrocitos

El procedimiento que se sigue para lograr la encapsulación de Amicacina es básicamente el que se detalla a continuación.

Se recoge la sangre de rata empleando EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante. Tras una primera centrifugación a  $2200 \text{ min}^{-1}$  a  $4^\circ \text{C}$  durante 10 minutos, se retira el plasma, se lavan los eritrocitos con tampón isoosmótico Hanks-PBS (2), para desechar otros componentes sanguíneos distintos de los eritrocitos, y se ajusta a un hematocrito del 50 %.

#### Diálisis hipoosmótica

Posteriormente 1 mL de esta suspensión de eritrocitos se introduce en una membrana de diálisis y se obtiene el hinchamiento de los eritrocitos por diálisis frente a 50 mL de tampón hipoosmótico (15 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 15 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 20 mM glucosa, 3 mM glutatión reducido, 2 mM ATP; pH 7.4) con una concentración de Amicacina de 0.5 mg/mL durante 45 minutos a  $4^\circ \text{C}$ .

#### Etapa final

Posteriormente se realiza una "annealing" durante 10 minutos a  $37^\circ \text{C}$  en tampón isoosmótico en proporción 1:50 (v/v) y resellado durante 30 minutos con tampón hiperosmótico en proporción de 10:1 (v/v).

Una vez encapsulado el fármaco en los eritrocitos, se procede a la caracterización de los eritrocitos cargados.

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

### 1. Morfología de las células.

La morfología de las células cargadas se evalúa mediante microscopía óptica y electrónica de barrido.

### 2. Contenido en principio activo.

El contenido de Amicacina se evalúa, previa lisis de los eritrocitos, mediante una técnica espectrofotométrica que recurre a la derivatización del antibiótico con o-ftaldialdehído (OPA) (3).

La lisis de los eritrocitos se produce mediante desnaturalización con ácido tricloroacético (TCA). Tras agitación y centrifugación a 3200 rpm durante 5 minutos se recoge el sobrenadante, se añade hidróxido sódico y tampón fosfato pH=11, con objeto de obtener una solución a pH neutro que se valora por espectrofotometría UV previa derivatización.

El reactivo derivatizante está compuesto por OPA, tampón borato pH=10.4 y metanol.

### 3. Medidas de fragilidad osmótica.

Se realizan estudios comparativos de fragilidad osmótica de eritrocitos cargados con antibiótico y de células blanco con el fin de evaluar la resistencia hiposmótica de las células. Para ello se incuban las células en soluciones de NaCl de distintas concentraciones, las suspensiones se centrifugan y se determina, en el sobrenadante, la hemoglobina liberada por absorbancia.

### 4. Resistencia a la agitación y al choque osmótico.

Para determinar la resistencia al choque osmótico, se diluye una suspensión de eritrocitos en agua destilada, se centrifuga y se evalúa la hemoglobina presente en el sobrenadante.

La resistencia de las células a la agitación turbulenta se mide pasando una suspensión de eritrocitos a través de una aguja de calibre 22 y determinando la liberación de hemoglobina.

### 5. Cesión del fármaco y de hemoglobina.

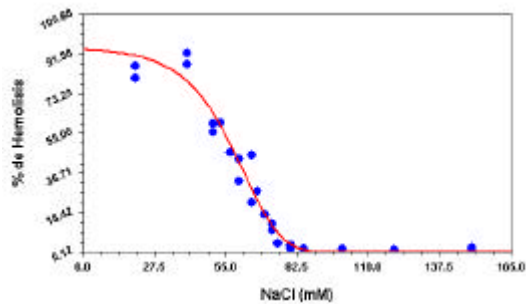
Se evalúa periódicamente la cesión de fármaco al sobrenadante mediante la técnica espectrofotométrica que recurre a la derivatización con OPA y detección ultravioleta.

La hemoglobina liberada se evalúa espectrofotométricamente comparando la absorbancia del sobrenadante de las células tratadas con la obtenida por hemólisis del mismo número de células en agua destilada.

## Resultados y Discusión

La figura 1 muestra la variación en el porcentaje de hemólisis de los eritrocitos frente a la concentración de NaCl. A partir de esta relación se puede establecer la influencia de la osmolalidad de la disolución en la hemólisis de los eritrocitos y determinar el intervalo de osmolalidad que resulta crítico para la encapsulación del fármaco.

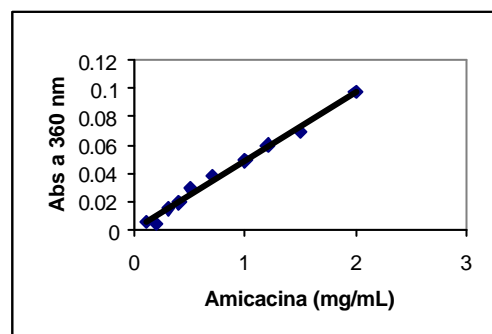
En función de los resultados obtenidos se estableció que la composición inicial del tampón hiposmótico debería oscilar entre 100 y 200 mOsm/kg.



**Figura 1.** Curva de hemólisis frente a la concentración de cloruro sódico.

Los factores que resultaron críticos en la encapsulación de Amicacina en eritrocitos fueron: composición del tampón, pH y osmolalidad del medio.

El rendimiento de la encapsulación se determina empleando la técnica espectrofotométrica. La figura 2 muestra la curva de calibración de Amicacina en el medio tamponado.



**Figura 2.** Recta de calibrado de Amicacina.

En las condiciones de encapsulación utilizadas el rendimiento del proceso estaba comprendido entre 10 y 20 mg de Amicacina/gr de eritrocitos. Las pruebas de caracterización realizadas muestran que los eritrocitos cargados con Amicacina presentan una morfología y homogeneidad adecuada. Asimismo, la fragilidad osmótica y resistencia de los eritrocitos cargados resultó apropiada.

### Bibliografía

1. H. G. Eichler, M. D., S. Gasic, M. D., K. Bauer, M. D., A. Korn, M. D., and S. Bacher, M. D. In vivo clearance of antibody-sensitized human drug carrier erythrocytes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 40, 300, (1986).
2. Silvia Sanz, Carmen Lizano, José Luque and Montserrat Pinilla, In vitro and in vivo study of glutamate dehydrogenase encapsulated into mouse erythrocytes by a hypotonic dialysis procedure, *Life Sciences*, 65, 2781, (1999).
3. M. Santos, E. García, F. G. López, J. M. Lanao, A. Domínguez-Gil. Determination of Netilmicin in plasma by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, 1059, (1995).

### Agradecimientos:

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto SAF-2001-0740 del programa I+D+I y con fondos FEDER.

### Autor de contacto:

José Martínez Lanao

*jmlanao@usal.es*

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca*

*Avda Campo Charro s/n (Campus Unamuno) 37007*

*Salamanca*

*Salamanca*

*Telf.: 923294536*

*Fax: 923294515*