

ESTUDIO DE LA ENCAPSULACIÓN DE ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS EN LIPOSOMAS MULTILAMINARES.

Pedrajas Reca F.M., Medina Pérez M.M.

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

Introducción

La asociación química de la sustancia activa a un sistema transportador apropiado, permite el desarrollo de formulaciones alternativas para la administración de los fármacos en las mejores condiciones de eficacia y seguridad. Estos sistemas de liberación controlada, poseen la beneficiosa característica de reconocer la célula "diana", con lo cual el fármaco es conducido específicamente a su lugar de acción; por lo tanto, se reduce en todo lo posible la posología o cantidad de fármaco a administrar, disminuyen los efectos secundarios y, al mismo tiempo, se impide la acción del principio activo sobre otras células que no sean la célula "diana" o biofase. Existen, en la actualidad, diversos sistemas que se están investigando con el propósito de conferir a una sustancia medicamentosa especificidad de acción; entre los cuales podemos destacar: proteínas plasmáticas, anticuerpos específicos, hormonas peptídicas, ácidos nucleicos, polisacáridos, microcápsulas, nanocápsulas, nanopartículas, partículas de latex y liposomas (1).

Siendo éstos últimos el motivo de nuestra investigación, pasaremos a continuación a describirlos brevemente. Los liposomas son vesículas microscópicas constituidas por bicapas lipídicas concéntricas (2), alternando con compartimentos acuosos. De forma y estructura diversas, sus dimensiones oscilan entre 0'1 μm y 10 μm . Se obtienen, principalmente, por dispersión de fosfolípidos naturales o sintéticos, derivados del ácido fosfórico, en una solución tamponada, a una temperatura superior a la de transición de los mismos. Se les considera sistemas de liberación debido a su capacidad

para transportar sustancias activas hidrófilas en el compartimento acuoso y sustancias activas hidrófobas entre los fosfolípidos de la capa biomolecular.

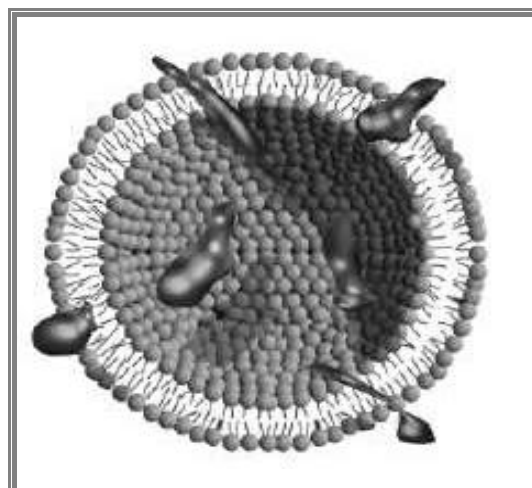


Fig. 1: Liposoma con detalle de la pared formada por una bicapa de fosfolípidos. En el interior una representación de los exopolisacáridos

Debido a su composición, semejante a la de las membranas celulares, han sido durante muchos años modelos bioquímicos para el estudio de la permeabilidad celular (3). Al comprobarse el aumento en la biodisponibilidad biofásica del fármaco por su incorporación a liposomas, la aplicación terapéutica de estos sistemas (4) ha ido desarrollándose paulatinamente, y en la actualidad puede concretarse su uso en el tratamiento de enfermedades metabólicas, observándose una prolongación de la retención hepática de la enzima en cuestión, tras su encapsulación; asimismo, la posibilidad de

administrar el gen que gobierna la síntesis de dichas enzimas indica una futura utilización de estas vesículas en ingeniería genética (5).

El objetivo principal de esta investigación consiste en el desarrollo de formulaciones alternativas (6) para la administración de clomipramina e imipramina, en condiciones de eficacia y seguridad, mediante su asociación química a un sistema transportador (liposomas). Este sistema de vectorización (7) permitiría paliar los inconvenientes derivados de la terapia mediante formas farmacéuticas convencionales, incrementando la concentración del fármaco en la biofase y reduciendo su posología (8). Todo ello se traduciría en una disminución de los efectos secundarios derivados de su administración.

En este sentido, se procede en primer lugar a la adaptación del método de elaboración de liposomas multilaminares (MLV), descrito por Bangham y col., a las características propias de los principios activos seleccionados (normalización).

Posteriormente, se efectúa un estudio individualizado de la encapsulación de los dos antidepresivos en estos vectores. Para ello, se preparan diferentes formulaciones de liposomas, modificando sus componentes así como las proporciones de los mismos.

Los componentes elegidos para la composición de las bicapas lipídicas han sido un fosfolípido de origen natural (fosfatidilcolina de huevo) y un esteroles (colesterol); éste último siempre se utiliza en una cantidad equivalente al 50% de la concentración lipídica, que posibilite elaborar liposomas con un adecuado grado de estabilidad y evitar la presencia de cristales de colesterol en las muestras diseñadas.

Los datos experimentales obtenidos permitirán seleccionar las formulaciones más idóneas, que hagan viable la obtención de los liposomas y aporten óptimos resultados de encapsulación de los fármacos ensayados.

Materiales y Métodos

Los liposomas multilaminares se han obtenido por el método descrito por Bangham y colaboradores (9), previamente normalizado en nuestro laboratorio.

Los componentes de las formulaciones, que serán la base de la matriz lipídica, han sido fosfatidilcolina natural de origen animal, fosfatidilcolina pura de huevo (PC) y colesterol (CH), en diferentes proporciones molares. La inclusión de dicho esteroles en la bicapa lipídica de estos vectores tendría por objeto incrementar la rigidez de la matriz liposomial, reduciendo su permeabilidad. Este efecto se traduciría en un mayor grado de retención del fármaco captado por estos vectores, hasta su llegada a la biofase y en un incremento de su estabilidad a lo largo del tiempo.

El método utilizado consiste en la hidratación de una película lipídica obtenida al evaporar al vacío, empleando un rotavapor Büchi modelo 110 y un baño termostático a una temperatura constante de 37°C, el cloroformo donde estaban solubilizados los componentes de la pared de las vesículas. Para realizar la hidratación se utilizó una solución tamponada de pH 7,17 ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} - \text{PO}_4\text{HNa}_2$), en la cual la clomipramina (CLO) y la imipramina (IMI) estaban solubilizadas, obteniéndose una suspensión de liposomas en el exceso de la solución acuosa. Debido al carácter hidrosoluble de ambos principios activos, éstos irán vehiculizados en los compartimentos acuosos de los liposomas.

Posteriormente, la suspensión resultante se agitó durante 20 minutos a una temperatura superior a la de transición del fosfolípido (25-30°C para la PC) manteniéndose en reposo durante 24 horas en oscuridad y a baja temperatura (10) para favorecer el crecimiento y formación de los liposomas.

A continuación, las suspensiones que contienen los liposomas formados se centrifugan a 1000 r.p.m. durante 15 minutos y después se filtra el sobrenadante de cada una de las suspensiones, con el fin de separar las vesículas lipídicas del principio activo libre en el medio acuoso.

Por último, en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Hitachi 124 provisto de registrador y célula de flujo continuo, se realizó la valoración de las fracciones de cada principio activo no encapsulado a la longitud de onda de 252 nm para la clomipramina y a 250 nm para la imipramina, en solución de fosfatos a pH 7,17. Las determinaciones espectrofotométricas se

efectuaron posteriormente a la separación mediante centrifugación, utilizando como blanco una solución tampón fosfato de pH 7,17. Los valores de absorbancia determinados para cada fracción permitieron calcular los porcentajes de cada sustancia activa libre en el medio, mediante una curva patrón de calibrado. A partir de estos valores y en base a la concentración inicial de fármaco utilizada en cada formulación, se calculó porcentaje de principio activo captado por cada una de las fórmulas diseñadas.

Resultados y Discusión

Las formulaciones elaboradas se recogen en la tabla 1 para la clomipramina y en la tabla 2 para la imipramina, indicándose su composición, proporción molar y concentración de los diferentes integrantes de las mismas, expresadas en mg/100ml.

Tabla 1. Formulaciones de liposomas transportadores de Clomipramina elaborados.

Formulación	Proporción molar	mg/100ml		
Número	PC : CLO	PC	CLO	
1	1 : 1	224'3	100	
2	2 : 1	448'6	100	
3	3 : 1	672'9	100	
Formulación	Proporción molar	mg/100ml		
Número	PC : CH: CLO	PC	CH	CLO
4	1 : 0'5:1	224'3	55'1	100
5	2 : 1 : 1	448'6	110'2	100
6	3 : 1'5 : 1	672'9	165'3	100

Tabla 2. Formulaciones de liposomas transportadores de Imipramina elaborados.

Formulación	Proporción molar	mg/100ml		
Número	PC : IMI	PC	IMI	
1	1 : 1	247'9	100	
2	2 : 1	495'8	100	
3	3 : 1	743'7	100	
Formulación	Proporción molar	mg/100ml		
Número	PC : CH: IMI	PC	CH	IMI
4	1 : 0'5:1	247'9	60'9	100
5	2 : 1 : 1	495'8	121'8	100
6	3 : 1'5 : 1	743'7	182'6	100

Tras la obtención de los liposomas, éstos fueron sometidos a un proceso de centrifugación a 1000 r.p.m. durante 15 minutos, para separar los liposomas del principio activo libre en el medio. La valoración espectrofotométrica ha aportado una serie de valores que corresponden a los porcentajes de clomipramina e imipramina que han sido encapsuladas en los liposomas. Los resultados de la encapsulación en liposomas multilaminares de fosfatidilcolina de huevo y de este fosfolípido y colesterol se incluyen en las tablas 3 y 4 para los principios activos de clomipramina e imipramina, respectivamente. Asimismo estos datos se representan gráficamente en las figuras 2 (clomipramina) y 3 (imipramina).

Tabla 3. Captación de Clomipramina en liposomas multilaminares.

Muestra	Proporción molar	Determinaciones
Número	PC : CLO	% p.a. captado
1	1 : 1	21'95
2	2 : 1	30'38
3	3 : 1	19'02
	PC : CH : CLO	
4	1 : 0'5 : 1	21'40
5	2 : 1 : 1	15'37
6	3 : 1'5 : 1	19'22

Tabla 4. Captación de Imipramina en liposomas multilaminares.

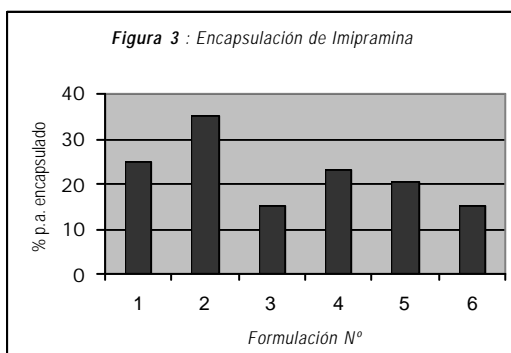
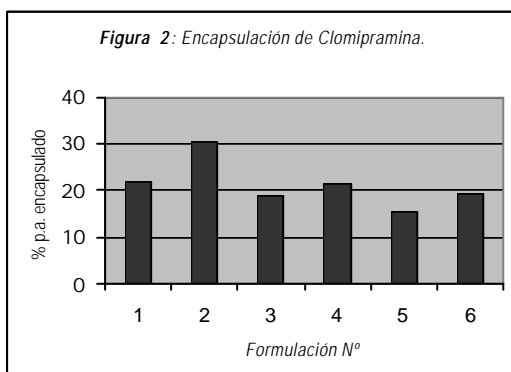
Muestra	Proporción molar	Determinaciones
Número	PC : IMI	% p.a. captado
1	1 : 1	24'98
2	2 : 1	35'29
3	3 : 1	15'02
	PC : CH : IMI	
4	1 : 0'5 : 1	23'11
5	2 : 1 : 1	20'28
6	3 : 1'5 : 1	15'28

Las formulaciones de liposomas de Clomipramina e Imipramina estudiadas con mayor rendimiento de obtención y, por tanto, con mayor porcentaje de sustancia activa captada o encapsulada corresponden a las formulaciones de PC: CLO y PC: IMI, ambas en proporción molar de 2:1 (fórmula número 2), con valores de porcentaje de principio activo captado de 30'38% y 35'29%, respectivamente, como podemos observar en las figuras 2 y 3. Estos valores de

captación resultan muy elevados en comparación con los reflejados en la bibliografía consultada y referidos también a fármacos hidrosolubles de captación a nivel de los compartimentos acuosos de los liposomas.

Por otra parte, también podemos deducir que la adición de colesterol a las formulaciones número 2 de liposomas de Clomipramina e Imipramina, produce una reducción en el porcentaje de sustancia activa encapsulada. Estos valores de captación apenas se modifican en el resto de fórmulas elaboradas, como consecuencia de la adición de dicho estero.

De estos ensayos preliminares podríamos seleccionar en principio, para los dos fármacos, la formulación número 2 como la de mayor captación sólo con fosfolípido, y la formulación número 4 también con elevada tasa de encapsulación, pero teóricamente de mayor estabilidad debido a la presencia de colesterol. Esta primera selección en el futuro debería confirmarse con estudios de caracterización estructural y de estabilidad a lo largo del tiempo.



Bibliografía

1. Patel HM. Liposomes as a Controlled-Release Systems. *Biochems. Biochem Soc Trans* 1985; 13:513-6.
2. Mezei M. Liposomes as a skin drug delivery system. En: Breimer DD, ed. *Pharmaceutical sciences*. Amsterdam: Elsevier, 1992:345-58.
3. Mezei M, Gulasekharan V. Liposomes -A selective drug delivery system for the topical route of administration. *Life Sci* 1980;26:1473-7.
4. Mezei M. Liposomes as penetration promoters and localizers of topically allied drugs. En: Hsieh D, ed. *Drug Permeation enhancements: theory and application*. New York: Marcel Dekker, 1993; 171-97.
5. Fidler J.J. The use of liposomes as drug carriers in the immunotherapy of cancer. En: Roerdink FHD, Kroon AM, eds. *Drug Carrier systems*. New York: John Wiley, 1989: 213-48
6. Wolhrad W, Lasch J, Laub R, Taube M, Wellner K. Distribution of liposome encapsulated ingredients in human skin ex vivo. En: Braun-Falco O, Korting HC, eds. *Liposome dermatics*. Berlin: Springer-Verlag, 1992:215-25.
7. Krowczynski L, Stozek T. Liposomes as drug carriers in transdermal therapy. *Pharmazie* 1984;39:627-9.
8. Korting HC. Increased activity and tolerability of a conventional glucocorticoid in a liposomal form. En: Braun-Falco O, Korting HC, ed. *Liposome dermatics*. Berlin: Springer-Verlag, 1992:320-8.
9. Bangham A.D., Hill M.W., Miller N.G.A.: *Methods Membran Biol.*, 1974.
10. Medina Pérez MM, Cerezo Galán A, Sánchez MJ. Estudio de la congelación como método de conservación de liposomas. Efecto de la adición de sustancias crioprotectoras. *Pharmaklinic* 1989; 3(3):121-5.

Autor de contacto:

Francisco Manuel Pedrajas Reca

pacopedrajas@yahoo.es

Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

Facultad de Farmacia. Universidad de Granada

Ruiseñor, 4, 2º C. 18014 Granada

Granada

Telf.: 678 84 18 09