

INFLUENCIA DEL TIPO DE BICAPA Y DEL AGENTE GELIFICANTE EN LA LIBERACIÓN DE ACICLOVIR A PARTIR DE HIDROGELES LIPOSÓMICOS

Manuel Córdoba Díaz¹, Begoña Elorza Barroeta², María Ángeles Elorza Barroeta² y Manuel Córdoba Borrego¹

¹ Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. E-28040-Madrid

² Dpto. de Química-Física II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. E-28040 Madrid

Resumen

Se han realizado una serie de experimentos de difusión a través de una membrana de diálisis con el fin de determinar la permeabilidad del aciclovir en función del tipo de bicapa liposómica en que se encuentre encapsulado y la influencia de incorporar estas suspensiones en un sistema tipo gel en dicho proceso. Estos experimentos se han realizado en celdas de difusión de flujo continuo.

De entre las bicapas estudiadas (DOPC, POPC y SPC3-CHOL) se ha visto que los liposomas DOPC son los que presentan una mayor permeabilidad.

Se ha observado además que la proporción del agente gelificante (Carbopol 980) en la formulación ejerce un papel importante en la capacidad de la misma para liberar el aciclovir. Así, geles con un 0,5% de Carbopol liberaron aproximadamente un 75% del principio activo dosificado en un ensayo de difusión de 24 horas; incrementando dicho componente hasta un 1,5% sólo se llegaron a liberar porcentajes de aciclovir del orden de un 55% en las mismas condiciones. Estos hechos deben ser tenidos en cuenta durante el diseño de la formulación de un gel liposómico de aciclovir.

Abstract

A series of diffusion experiments through a dialysis membrane has been carried out in order to study the permeability of Acyclovir (ACV) as a function of the kind of bilayer in which it is

encapsulated and the influence of the inclusion of these suspensions in a gel system on such process. These experiments were performed using flow-through diffusion cells.

Among the different bilayers studied (DOPC, POPC y SPC3-CHOL) it was found that liposomes DOPC showed higher permeability values.

It was also observed that the amount of gel former (Carbopol 980) in the formulation plays an important role in its ability to deliver the ACV. In this way, hydrogels containing 0.5% Carbopol were able to release about 75% of the drug along 24 hours of diffusion, whereas only 55% was diffused in the same time with 1.5% Carbopol. These phenomena should be taken into account in the design of an ACV liposomal gel.

Introducción

El aciclovir es uno de los fármacos de primera elección en el tratamiento por vía tópica del herpes cutáneo causado por el virus Herpes simplex. El inconveniente principal de dicho tratamiento radica en la dificultad del principio activo para alcanzar de forma efectiva la zona "diana", esto es la capa basal de la epidermis por ser en estos tejidos donde se produce la replicación masiva del virus (1,2).

La utilización de liposomas es una de las estrategias que puede incrementar de manera eficaz la penetración del ACV hasta el lugar de acción (3). En el presente estudio se han ensayado diferentes composiciones de bicapa

para la elaboración de liposomas, y se ha analizado la permeabilidad de cada una al paso de principio activo. Para ello se ha utilizado un equipo de difusión de flujo continuo en el que la formulación liposómica (suspensión o gel) se dispone en el compartimento donador. El ACV difunde a través de la membrana de diálisis hasta el compartimento receptor donde se encuentra el fluido receptor que está sometido a un flujo de entrada y de salida. Dicho fluido receptor se recoge a determinados períodos de tiempo y se analiza en el mismo la cantidad de principio activo difundida en función del tiempo. El ajuste de diferentes modelos cinéticos a los datos obtenidos nos permitirá determinar la permeabilidad comparada de unos sistemas frente a otros.

Materiales y Métodos

Se utiliza un equipo de difusión PermeGear ILC-07 dotado con siete celdas en las que el área de permeación efectiva es 0,78 cm², el volumen del compartimento donador es 1,10 cm³, el volumen del compartimento receptor es 0,85 cm³ y la temperatura de termostatación del equipo es de 37° C. Como medio receptor se utilizó solución tampón HEPES (pH = 7,4) a un flujo de 2 mL/h.

Tras determinar las concentraciones de ACV en las muestras de compartimento receptor a cada tiempo por HPCL y asumiendo que la acumulación de principio activo en el compartimento receptor es despreciable por el pequeño volumen de dicho compartimento, el flujo intrínseco aparente (J) (μg/cm² h) en cada diferencial de tiempo puede calcularse en función de la evolución de la concentración en el compartimento receptor (C_{rec}) según la siguiente expresión:

$$V_{rec} \cdot \frac{dC_{rec}}{dt} = J \cdot S - F_{rec} \cdot C_{rec}$$

donde V_{rec} es el volumen del compartimento receptor, S el área efectiva de difusión y F_{rec} el flujo del medio receptor. Teniendo en cuenta que nuestros ensayos se encuentran englobados en los sistemas de dosis finita, los valores de flujo intrínseco aumentan rápidamente en los primeros momentos hasta alcanzar un máximo de velocidad de cesión (J_{max}) tras el cual

comienzan a descender de nuevo. Ese valor de flujo máximo se conoce como flujo intrínseco en el estado estacionario, a partir del cual se obtiene directamente el coeficiente de permeabilidad del proceso (Kp en cm/h) (4, 5).

La comparación de los parámetros antes mencionados nos da una idea acerca de las bicapas que son capaces de liberar el aciclovir de forma más rápida. No obstante, con el fin de estimar las constantes de velocidad de salida del aciclovir y de la carboxi-fluoresceína de los liposomas, se recurre a un ajuste matemático de los perfiles acumulados de cesión, utilizando modelos de acuerdo con las reacciones consecutivas o en cadena, asumiendo que el proceso total de difusión estudiado posee dos pasos diferenciados según cinéticas de orden 1:



El ajuste cinético que nos permite estimar ambas constantes (expresadas en h⁻¹) sigue el siguiente modelo matemático:

$$Q_{rec} = Q_0 \cdot \left[1 - \left(1 + \frac{K_1}{K_2} \right) \cdot e^{-K_1 t} \right]$$

Donde Q₀ es la cantidad (μg) de principio activo encapsulada inicialmente y Q_{rec,t} las cantidades cedidas a través de la membrana de diálisis acumuladas en función del tiempo.

La comparación de los valores resultantes de K₁ para cada tipo de bicapa nos indicará la velocidad de salida del principio activo encapsulado en cada caso mientras que los parámetros J o Kp serán más útiles para la comparación global del proceso por lo que cobran más importancia en los estudios en geles.

Resultados y Discusión

Entre los parámetros obtenidos en los estudios iniciales de permeabilidad comparada de distintas bicapas destacan los recogidos en la tabla 1, destacando la concentración de partida en solución donadora (C₀ en μg/mL), el tiempo de latencia (T₀ en h), el coeficiente de permeación (Kp en cm/h) y comparando todos

estos datos con la K_1 , constante de velocidad de salida desde los liposomas (h^{-1}).

Tabla 1. Parámetros de permeación de los perfiles medios ajustados para cada formulación de carboxi-fluoresceína o aciclovir.

Ensayo	C_0	t_0	K_p	K_1
CF libre	6,00	0,058	0,1027	0,1679
CF - lip DOPC	88,03	0,626	0,0084	0,1125
CF - lip POPC	455,83	0,485	0,0132	0,0520
ACV libre	1500,0	0,053	0,1967	0,4079
ACV - lip DOPC	58,59	0,362	0,1064	0,2152
Acv - lip POPC	73,88	0,587	0,0710	0,1348
Acv - lip SPC-3-CHOL	113,73	0,039	0,0202	0,0170

Hay que destacar que en los ensayos con principio activo libre (en disolución), la constante de velocidad de salida del liposoma K_1 carece de significado físico y no se usa desde el punto de vista comparativo con los otros experimentos. Si nos centramos en estos datos con las formulaciones de ACV y los analizamos gráficamente obtenemos la Figura 1:

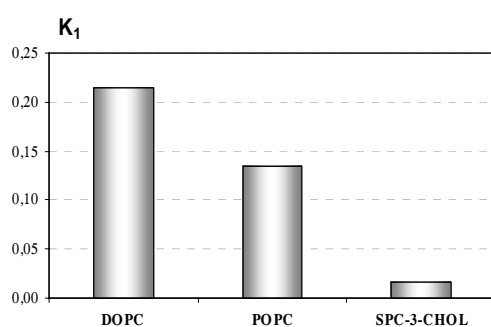


Figura 1. Constante de salida del liposoma para el ACV en función de la composición de la bicapa

Como podemos observar la permeabilidad de las bicapas estudiadas para el aciclovir es DOPC > POPC > SPC3-CHOL. Los ensayos realizados con carboxi-fluoresceína confirman dicha tendencia a pesar de tratarse de una molécula mucho más hidrófila que el ACV. Este orden de permeabilidad se confirma también con los valores de K_p (que reflejan el proceso total de salida del liposoma y de paso por la membrana de diálisis) para los experimentos con aciclovir. No obstante, en los liposomas SPC3-CHOL se

observa un tiempo de latencia inferior al del resto de los experimentos con liposomas indicando una salida inicial más rápida que se ve rápidamente ralentizada.

En los siguientes estudios, en los que se quería ver la **influencia del gel sobre la liberación de aciclovir de los liposomas**, se realizaron estudios en los que se seleccionaron las composiciones DOPC y POPC por ser las que proporcionaron mayores velocidades de salida del ACV al ser liposomas ultradeformables, a diferencia de los SPC-3-CHOL. Hay que destacar que aquí se encuentra principio activo tanto dentro como fuera de los liposomas. En estos casos, la suspensión liposómica se incluyó en el seno de un gel con un 0,5% de Carbopol. El primer paso del proceso aquí no lo constituye sólo la salida del aciclovir del liposoma sino que engloba también su migración a través del gel hasta el lugar de difusión, en contacto con la membrana. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2:

Tabla 2. Parámetros de permeación de los perfiles medios ajustados para cada formulación de ACV.

Ensayo	t_0	K_p	K_1
Acv libre en solución	0,095	0,2341	0,1912
Acv en gel	0,085	0,1044	0,0377
Acv gel liposómico DOPC	0,110	0,0746	0,0668
Acv gel liposómico POPC	0,091	0,0694	0,0410

Se aprecia que la formación de un sistema gel ralentiza considerablemente la liberación del ACV de la formulación, disminuyendo la K_p hasta un 50% cuando se compara la solución con el gel. Cuando se formula el aciclovir en geles liposómicos no se aprecia una diferencia significativa en el tiempo de latencia debido a que existe principio activo también fuera de los liposomas. Los valores de K_p y K_1 corroboran que los liposomas DOPC presentan una permeabilidad superior que los POPC, incluso en gel.

Finalmente, en los estudios encaminados a dilucidar la influencia de la viscosidad del gel en función de la proporción de agente gelificante se ensayaron tres proporciones de Carbopol: 0,5, 1 y 1,5 % p:p con respecto a la formulación total.

En los tres casos se formularon los geles con dosificaciones de ACV del 0,2%. Los perfiles de cesión comparados de los tres ensayos se reflejan en la Figura 2:

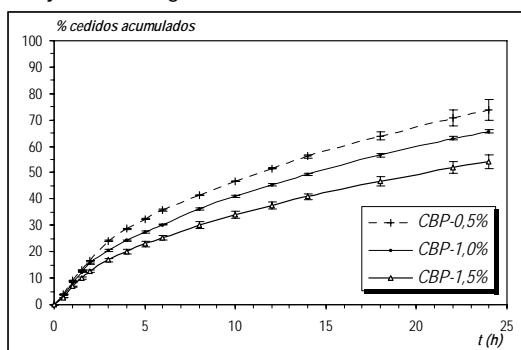


Figura 2. Perfiles de cesión comparados de tres geles de ACV con cantidades crecientes de Carbopol (CBP). Valores medios \pm desv. est.

A partir de estos perfiles se obtuvieron los parámetros de difusión que se recogen en la tabla 3:

Tabla 3. Parámetros de permeación de los perfiles medios ajustados para cada formulación de ACV en función de la concentración de agente gelificante (expresada en % p:p).

% Carbopol	C_0	t_0	K_p	K_1
Gel - 0,5 %	1820,0	0,059	0,1511	0,0891
Gel - 1,0 %	1680,0	0,084	0,1461	0,0801
Gel - 1,5 %	1860,0	0,118	0,1146	0,0833

En los datos de permeabilidad comparada de geles de viscosidad creciente se observa que la migración del aciclovir a través del gel juega también un papel importante en el proceso de liberación del principio activo. Esto se confirma con incrementos en el t_0 y disminuciones en las constantes cuando se aumenta la proporción de agente gelificante. Las diferencias son notables cuando se comparan geles de proporciones que difieren en un 1% de Carbopol en su composición. En este sentido, el gel de 0,5% es capaz de liberar un $73,83 \pm 3,88$ % de su contenido en aciclovir total a las 24 horas mientras que el gel de 1,5% sólo llega a liberar un $54,23 \pm 2,56$ % al mismo tiempo y en las mismas condiciones.

En resumen, concluimos que los liposomas ensayados presentan una permeabilidad diferente para el ACV en función de la composición de la bicapa, siendo los más permeables los de composición DOPC seguido de los POPC. Este fenómeno se ha comprobado no sólo en suspensiones liposómicas sino también en geles. Los liposomas SPC-3-CHOL poseen permeabilidades significativamente inferiores, debido a su estructura mucho más rígida. Además, la proporción de agente gelificante en el gel modifica su viscosidad, lo que se ha comprobado influye significativamente sobre el proceso de liberación del ACV. Estos datos deben ser tenidos en cuenta a la hora de diseñar una formulación de gel liposómico de ACV.

Bibliografía

- Hayden, F.G., Fármacos antivirales EN Goodman & Gilman, Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 9ª Ed., Mc Graw - Hill - Interamericana, pp 1265 - 1290, 1996.
- Parry, G.E., Dunn, P. Shah, V.P., Pershing, L.K., Acyclovir Bioavailability in Human Skin, J. Invest. Dermatol, 98 (6), 856-863, (1992).
- Law, S., Huang, H.Y., Properties of Aciclovir-containing liposomes for potencial ocular delivery, Int. J. Pharm., 161, 253-259, (1998).
- Squier, C.A., Kremer, M., Wertz, W., Continuous flow mucosal cells for measuring the in vitro permeability of small tissue samples, J. Pharm. Sci., 86 (1), 82-84, (1997).
- Harrison, D.J., Knutson, K., Accurate determination of skin flux from flow-through diffusion cell data, Pharm. Res., 12 (12), 2003-2011, (1995).

Autor de contacto:

Nombre y apellidos: **Manuel Córdoba Díaz**

e-mail: mcordoba@farm.ucm.es

Institución: Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Dirección: Ciudad Universitaria. Avda. Complutense, E-28040.

Ciudad: Madrid

Tel.: 91-394-1741 / -1727

Fax: 91-394-1736