

DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN BIOADHESIVA DE LIBERACIÓN CONTROLADA PARA SU ADMINISTRACIÓN PERIODONTAL

C. Aguzzi¹, A. Gatti¹, P. Cerezo², S. Rossi¹, MT. Viseras², F. Ferrari¹, C. Viseras² y C. Caramella¹

¹Departamento de Química Farmacéutica, Universidad de Pavia, I

²Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, E

Resumen / Abstract

En las últimas décadas se han desarrollado sistemas de liberación controlada y sitio-específica destinados al tratamiento de la periodontitis. El inconveniente principal de dichos sistemas reside en la necesidad de aplicar una sustancia adhesiva y externa a la formulación que garantice la permanencia en el lugar de acción durante el tiempo que dura la liberación. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de una formulación semisólida, de liberación controlada, y con características adecuadas de permanencia, sin necesidad de usar adhesivos. Para ello, se procedió a dispersar en una solución de quitosano (bioadhesivo) el producto de interacción obtenido al interponer Tetraciclina en un soporte arcilloso, capaz de controlar la liberación del fármaco. La formulación se optimizó en base a sus propiedades reológicas (viscosidad), en vista a favorecer su administración y asegurar su permanencia en el lugar de acción. Por otra parte, se evaluó su estabilidad física, al objeto de evitar la separación de las fases y su posible deshidratación con el tiempo. Por último, se procedió a determinar las propiedades de adhesión *ex vivo* de la formulación elegida en base a los estudios anteriores, utilizando encías porcinas como soporte biológico.

In the last decades, several controlled and targeted drug delivery systems have been developed to treat periodontal diseases. Among commercially available and experimental systems, the majority must be mechanically

bonded to the tooth surface to ensure retention into the periodontal pocket. In this work a new semisolid, bioadhesive, controlled release formulation based on Tetracycline, retained on pharmaceutical grade clay, has been developed. Formulation was obtained by dispersing the drug-clay interaction product in a chitosan solution. Formulation was optimised considering rheological properties (viscosity), aimed to administration (preferably by using a syringe) and retention into the periodontal pocket, and physical stability (lack of phase separation or dehydration). Finally, *ex vivo* mucoadhesion measurements were performed on the formulation, using porcine gum, as biological substrate.

Introducción

La enfermedad periodontal es una patología provocada por bacterias anaerobias que se acumulan en la placa dental, afectando al aparato de soporte de los dientes y muelas, y cursando como un proceso inflamatorio con base inmunológica, caracterizado por una destrucción progresiva de los tejidos que rodean las raíces de los dientes (ligamento periodontal) y el hueso de los maxilares [1].

Con el objetivo de lograr niveles terapéuticos de principio activo en el lugar de acción, durante un tiempo prolongado (varios días), se han propuesto sistemas sólidos y semisólidos (fibras y geles entre otros) de liberación controlada y sitio-específica de fármacos antibacterianos [2]. Un requisito imprescindible para un sistema destinado a la liberación localizada del principio

activo es su permanencia *in situ* por un tiempo suficiente para que sea eficaz (liberando la totalidad de la dosis). Por otra parte, resulta fundamental que presente unas adecuadas propiedades reológicas que permitan su administración (usualmente por medio de una jeringa). En este sentido, resulta necesario resaltar que los sistemas comerciales desarrollados hasta la fecha necesitan la aplicación de sustancias que actúen como pegamentos externos, para asegurar su permanencia, evitando que la forma farmacéutica se desprenda de la encía. Para evitar este inconveniente, y asegurar una adecuada liberación del principio activo a lo largo de un tiempo prolongado, nuestro trabajo se enfocó en el desarrollo de una formulación semisólida, multidosis, de liberación controlada de Tetraciclina, con propiedades intrínsecas de adhesión, para su empleo en el tratamiento de la enfermedad periodontal. El soporte de liberación controlada utilizado fue una arcilla laminar, con propiedades de intercambio catiónico, cuya interacción con tetraciclina se había estudiado previamente [3,4]. El vehículo semisólido para la dispersión del producto de interacción fue una solución acuosa de quitosano clorhidrato, polímero biodegradable, no tóxico y no irritante, conocido por sus propiedades de mucoadhesión y antibacterianas, incluyendo a algunos de los patógenos responsables de la enfermedad periodontal [5].

El objetivo de este trabajo fue la optimización de la formulación semisólida, tanto en lo que respecta a sus propiedades reológicas, en vistas a su administración (por medio de una jeringa) y permanencia en el lugar de acción, como en relación a su estabilidad física (evitando así la separación de las fases y su posible deshidratación), lo que resulta imprescindible para sucesivas administraciones. La viscosidad de la formulación se estudio de acuerdo a un diseño experimental, cuyos factores fueron la cantidad de producto de interacción a suspender y la concentración de la solución polimérica. Posteriormente, aquellas formulaciones cuyos valores de viscosidad resultaron adecuados para su empleo se guardaron (4°C) durante un mes, para determinar su estabilidad.

Finalmente, se evaluaron las propiedades de bioadhesión *ex vivo* de la formulación seleccionada por tener una viscosidad adecuada y aspecto homogéneo transcurrido un mes desde su elaboración, usando encías porcinas como soporte biológico.

Materiales y Métodos

Materiales

El principio activo utilizado fue Tetraciclina en forma de clorhidrato (Sigma Chimica, I).

La arcilla usada fue Veegum® HV (VHV) (R.T. Vanderbilt Co., USA).

Como polímero mucoadhesivo se utilizó quitosano clorhidrato (HCS) de elevada viscosidad (Seacure® CL 313, FMC Co., N).

Preparación del producto de interacción Tetraciclina-VHV

De acuerdo a Aguzzi et al. [3], el producto de interacción, en proporción fármaco-arcilla correspondiente a la máxima cantidad retenida, se elaboró mediante dispersión (agitador Ultra-Turrax mod. T25, Ika®-Labortechnik, A), de una cantidad conocida (500 mg) de arcilla en un volumen de 250 mL de solución acuosa de fármaco (2 mg/mL). Posteriormente, el sólido, separado por centrifugación se desecó (40° C, 24 horas), fue pulverizado por medio de un mortero de ágata y tamizado (< 125 µm).

Diseño experimental

Los factores estudiados fueron la cantidad de producto de interacción (PI) a suspender y la concentración de la solución de HCS, de acuerdo a un diseño experimental tipo Dohelert, caracterizado por su bajo número de experimentos, la posibilidad de ampliar el dominio experimental utilizando puntos experimentales de diseños anteriores, así como de seleccionar un mayor número de niveles para los factores que requieran más información [6].

Los niveles ensayados fueron tres (1, 1.5 y 2 % M/M) para la solución de HCS, y cinco (10, 15, 20, 25, 30 % M/M) para la cantidad de producto de interacción (PI). La variable respuesta fue la viscosidad de cada formulación, estimada a 37°C, tras aplicar un gradiente de deformación de 40 s⁻¹ durante 1 minuto (reómetro Rheo Stress

600, Thermo Haake, A, equipado con sistema de medida placa-cono de 35 mm/1°).

El análisis de varianza (ANOVA) de las respuestas experimentales se llevo a cabo por medio del programa estadístico Statgraphics® plus 5.1 (Statistical Graphics® Corporation, USA).

Estabilidad de las formulaciones

Aquellas formulaciones, caracterizadas por valores de viscosidad compatibles con su administración (valorada tras extrusión por medio de una jeringa Ligmaject®, Henke-Sass Wolf, A, equipada con cánula de diámetro 800 µm) y su permanencia en el lugar de administración, se guardaron a 4° C durante un mes, sometiénolas a un control periódico de su homogeneidad.

Propiedades de mucoadhesión *ex vivo*

Las medidas de mucoadhesión se llevaron a cabo por medio de un "dispositivo de medida de tensión-esfuerzo" [7]. 100 mg de formulación se pesaron sobre un disco de papel de filtro (área 2 cm²), fijado por medio de una cinta adhesiva a la parte móvil del aparato. En la parte fija (porta muestras), enfrentado a la formulación, se colocó un disco de área igual al anterior, sobre el que se pegó, por medio de un pegamento acrílico, la encía hasta recubrir totalmente la superficie. La encía se hidrató con 25 µl de fluido gingival simulado pH 6.6 [8], de composición; tampón cítrico 0.1 M/ Na₂HPO₄ 0.2 M [9]. La parte móvil se puso en contacto con el porta muestra, tras aplicar un precarga de 2500 mN durante 3 min., con el objetivo de establecer la interacción entre sustrato y la formulación. Posteriormente, se eliminó la precarga y se hizo avanzar la parte móvil, a velocidad constante de 4 mm/min, hasta lograr la total separación de las dos superficies. La mucoadhesión se expresó usando el parámetro AUC (trabajo de adhesión), calculado como el área bajo la curva fuerza de separación/desplazamiento [10]. Una solución de HCS de concentración igual a la usada en la formulación sirvió de control.

Resultados y Discusión

De acuerdo al ANOVA, la ecuación del modelo matemático utilizado para el ajuste de los datos experimentales fue:

$$\text{Viscosidad} = 1339,67 + 1722,6 \cdot \% \text{ PI} + 1870,45 \cdot \% \text{ HCS} + 704,283 \cdot \% \text{ PI}^2 + 1559,7 \cdot \% \text{ PI} \cdot \% \text{ HCS} + 793,112 \cdot \% \text{ HCS}^2$$

En la tabla I se representa la matriz del diseño experimental, junto a los valores experimentales y predichos por el modelo. El ensayo de pérdida de ajuste ("Lack of fit") indica que el modelo utilizado ajusta perfectamente los datos reales con un nivel de confianza del 95%.

Tabla I. Matriz del diseño y valores de viscosidad experimentales y predichos

Tratamiento (formulación)	Factores (% p/p)		Respuesta (mPa*s)	
	A: PI	B: HCS	Experimental	Predicha
1	15 (-0.5)	1 (-1)	156	357
2	25 (0.5)	1 (-1)	721	520
3	30 (1)	1.5 (0)	3566	3767
4	25 (0.5)	2 (1)	6021	5820
5	15 (-0.5)	2 (1)	2337	2538
6	10 (-1)	1.5 (0)	522	321
7	20 (0)	1.5 (0)	1143	1340
8	21 (0)	1.5 (0)	1410	1340
9	22 (0)	1.5 (0)	1466	1340

() Niveles codificados
Lack of fit (P= 0.1042)

De acuerdo con el ANOVA, tanto la cantidad de producto de interacción (A), como la concentración de HCS (B), y su recíproca interacción (AB), afectaron significativamente a la variable respuesta (viscosidad) con un nivel de confianza del 95%, (P <0.05). El efecto de los factores sobre la respuesta se concreta en un aumento de la viscosidad al aumentar el nivel de cada factor. Además, la interacción (AB) supone que el PI afecta más al aumentar el nivel de HCS (figura 1).

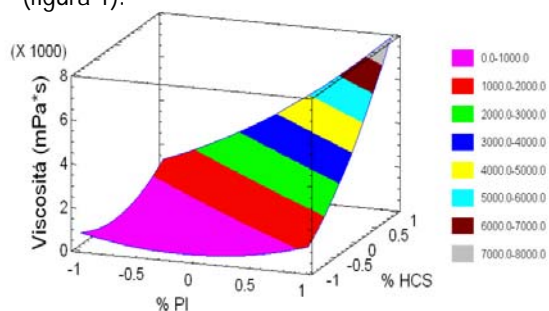


Figura 1. Superficie respuesta.

No obstante, niveles elevados de PI y HCS (formulación 4) resultaron incompatibles con la

extrusión de la formulación, de manera que el dominio experimental no fue ampliado por encima de los niveles examinados.

Por otra parte, valores menores de 1000 mPa·s no son adecuados para garantizar la permanencia *in situ* de la formulación [11]. Valores intermedios (entre 1500 y 4000 mPa·s) resultaron compatibles con la administración y la permanencia en el lugar de acción. Las formulaciones correspondientes (3, 5, 7), se guardaron durante un mes, en el que solo la formulación 5, constituida por el nivel más elevado (2%) de HCS e intermedio (15%) de PI, mantuvo su homogeneidad. Niveles mayores (30%) de sólido (formulación 3) y menores (1.5%) de HCS (formulación 7) daban como resultado la deshidratación o separación, respectivamente, de la dispersión.

En la figura 2, se representan los valores de AUC de la formulación optimizada y del control. La formulación presenta propiedades de mucoadhesión comparables (Mann Whitney test: N.S.) con las del HCS, indicando que la incorporación del sólido no afecta a las características de adhesión del polímero.

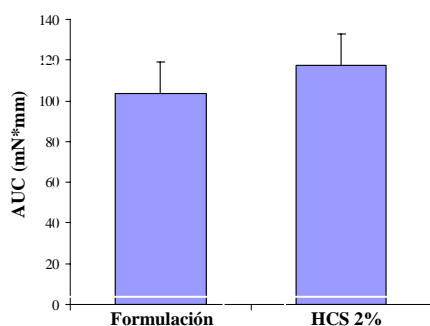


Figura 2. AUC de la formulación 5 y de la solución de HCS (promedio \pm e.s.; n=8).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto MAT2003-06606, del Ministerio de Ciencia y Tecnología

Bibliografía

1. Armitage GC, Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases, *Periodontology* 2000, 34, 9, (2001).

2. Vyas SP, Sihorkar V, Mishra V, Controlled and targeted drug delivery strategies towards intraperiodontal pocket diseases, *J. Clin. Pharm. and Ther.* 25, 21, (2000).
3. Aguzzi C., Viseras C., Garcés A., Cruz J., Cerezo P., Ferrari F., Caramella C., 1st EUFEPS Conference on Optimising Drug Delivery and Formulation: New Challenges in Drug Delivery, (Proceedings), 132, Versailles 2003.
4. Viseras C., Aguzzi C., Zafra M., Garcés A., Cerezo P., Caramella C., López-Galindo A, 1st EUFEPS Conference on Optimising Drug Delivery and Formulation: New Challenges in Drug Delivery, (Proceedings), 134, Versailles 2003.
5. İkinci G., Senel S., Akıncıbay H., Kas S., Ercis S., Wilson C.G., Hincal A.A., Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*, *Int.J. Pharm.*, 235, 12, (2002).
6. Nechar M., Molina M.F., Bosque-Sendra J.M., Application of Doehlert optimization and factorial designs in developing and validating a solid-phase spectrophotometric determination of trace levels of cadmium, *Analytica Chimica Acta*, 382, 117, (1999).
7. Ferrari F, Bertoni M, Rossi S, Bonferoni MC, Caramella C, Waring MJ, Aulton Me, Comparative rheomechanical and adhesive properties of two hydrocolloidal dressing. Dependence on the degree of hydration, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 22, 1223, (1996).
8. Deasy PB, Collins A., Mac Carthy DJ, Russel RJ, Use of strips containing tetracycline hydrochloride or metronidazole for the treatment of advanced periodontal disease, *J. Pharm. Pharmacol.*, 41, 694, (1989).
9. Mc Ilvaine TC, A buffer solution for colorimetric comparison, *J. Biol. Chem.*, 49, 183, (1921).
10. Rossi S, Ferrari F, Bonferoni MC, Bertoni M, Caramella C, *Eur. Symp On in vivo and ex vivo systems to rationalize drug design and delivery*, (Proceedings), 232, Paris 1994.
11. Mitchel JW, Prolonged release of biologically active somatropin, US patent 5411951, 1995

Autor de contacto:

Cesar Viseras Iborra

cviseras@ugr.es

Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Campus de Cartuja, s/n, Granada.

Tel: 958-249551

Fax: 958-248958