

ENCAPSULACIÓN DE IVERMECTINA EN MICROESFERAS LIPÍDICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ANISAKIDOSIS

Pablo José Hernández Benavides, Adela Valero López y Cristina Figueredo Flores.

Departamentos de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja s/n. 18071-Granada (España).

Resumen

El nematodo *Anisakis simplex* ha sido objeto de una gran atención debido a su amplia distribución, su elevada incidencia en numerosas especies de peces marinos y en consecuencia por su presencia como parásito humano. En este trabajo figura un detallado estudio de encapsulación de un agente antihelmíntico (ivermectina) en uno de los mejores sistemas de transporte y liberación de fármacos de la terapéutica actual, las microesferas lipídicas, como primer paso para establecer un nuevo tratamiento de la anisakidosis.

Los porcentajes de ivermectina encapsulada han sido superiores al 90 % en todas las formulaciones de microesferas lipídicas elaboradas.

Abstract

The nematode *Anisakis simplex* has been the subject of much attention due to its wide distribution, its high incidence in numerous species of marine fish and its consequent presence as a human parasite. This paper concerns a detailed encapsulation study of an anthelmintic agent (ivermectin) in one of the better drug transport and delivery system of the present therapeutic, the lipid microspheres, as first step to establish a new treatment of anisakidosis.

The percentages of encapsulates ivermectin have been higher than 90 % in all the lipid microspheres formulations elaborated.

Introducción

La anisakidosis es una parasitación producida por las larvas L₃ de la especie *Anisakis*

simplex, presentes en los tejidos de numerosas especies de peces marinos (1). El ser humano puede ser hospedador accidental de este nematode, sufriendo una afectación que puede ser no invasiva o invasiva tras el consumo de pescados crudos o poco cocinados, hábito frecuente en los países orientales.

En la actualidad no existe un tratamiento eficaz que destruya y elimine por completo las larvas de *Anisakis* del interior del organismo humano. Se han ensayado diversos agentes activos potencialmente efectivos frente a otros helmintos, como el pamoato de pirantel, el flubendazol y la piperazina (2).

La ivermectina (3), lactona macrocítica sintetizada por *Streptomyces avermitilis*, presenta una elevada acción larvicida frente a una gran variedad de parásitos nematodos, demostrándose su eficacia "in vitro" frente a las larvas L₃ y especialmente L₄ de *Anisakis simplex*, provocando su pérdida de motilidad en los primeros instantes de iniciado el ensayo (4). En un trabajo previo (5), se evaluó la incorporación de otro agente antihelmíntico (praziquantel) a uno de los sistemas de transporte y liberación de fármacos más prometedores de la terapéutica actual, las microesferas lipídicas. Se trata de emulsiones de fase externa acuosa (O/A) con un diámetro de fase interna inferior a 1 µm (6). Gozan de numerosas ventajas frente al resto de vectores, destacando su elevada estabilidad, la posibilidad de poder elaborarse a gran escala y ser del todo biodegradables (7).

En esta ocasión se pretende diseñar una nueva forma de dosificación de ivermectina incorporándola a microesferas lipídicas, que asegure su mayor eficacia, seguridad y biodisponibilidad y que suponga una innovación en el tratamiento de la anisakidosis.

Materiales y Métodos

Los productos utilizados en la elaboración de microesferas lipídicas portadoras de ivermectina han sido:

- Ivermectina (Sigma).
- Aceite refinado de soja (Roig Farma).
- Lecitina de soja (Roig Farma).
- Colesterol (Guinama).
- Tween® 80 (Roig Farma).
- Glicerina (Roig Farma).

Para el estudio de encapsulación se elaboraron siete formulaciones diferentes, modificando tanto los componentes que las integran, como sus concentraciones respectivas. En la tabla 1 se recoge la composición de cada una de ellas, expresando las concentraciones en g/100 ml de emulsión. La cantidad inicial de ivermectina fue de 20 mg/100 ml.

Fórmula (n°)	Concentración (g/100 ml)					
	AS	LS	COL	TW	GL	TOC
1	0,685	1,25	0,50	0,50	2,60	
2	0,685	1,25	0,25	0,50	2,60	
3	0,685	1,25		0,50	2,60	
4	0,685	1,25	0,50	0,25	2,60	
5	0,685	1,25	0,50		2,60	
6	1,360	1,25	0,50	0,50		
7	0,685	1,25	0,50	0,50	0,50	0,50

Tabla 1: Formulaciones de microesferas lipídicas portadoras de ivermectina (AS: aceite refinado de soja; LS: lecitina de soja; COL: colesterol; TW: tween® 80; GL: glicerina; TOC: acetato de DL- α -tocoferol).

El método de obtención de microesferas lipídicas es el descrito por Hernández y cols. (8): consiste, en primer lugar, en la solubilización por separado de los componentes liposolubles de la formulación (ivermectina, lecitina de soja, colesterol y acetato de DL- α -tocoferol) en el aceite refinado de soja y los hidrosolubles (tween® 80 y glicerina) en agua purificada. Posteriormente

se interponen y emulsifican ambas fases empleando un agitador Ultra-Turrax T-25 a 12000 r.p.m. durante 15 minutos, en tres intervalos de cinco minutos cada uno. La emulsión se homogeniza mediante filtración a través de membranas Millipore® de 1,20 μ m de diámetro de poro, ajustando el volumen final a 200 ml con cantidad suficiente de agua purificada.

Para determinar el porcentaje de principio activo captado por los vectores se separa previamente la fracción de ivermectina libre de la encapsulada mediante cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel, empleando un gel de dextrano (Sephadex® G-50, Pharmacia Fine Chemicals) como soporte y agua purificada como fase móvil.

La fracción libre, que eluye en segundo lugar, tras su disolución en alcohol etílico al 96 % (V/V) se valora por espectrofotometría UV (Perkin Elmer, Lambda 40) a 237,8 nm.

Por diferencia entre la cantidad inicial de ivermectina incorporada a las microesferas lipídicas (0,020 g/100 ml) y la cantidad libre, se determina la cantidad así como el porcentaje de agente activo encapsulado.

Resultados y Discusión

En la tabla 2 se recogen los resultados del porcentaje de ivermectina encapsulado por cada una de las siete formulaciones de microesferas lipídicas elaboradas. Los valores corresponden a la media de cinco determinaciones, acompañada de su correspondiente desviación estándar.

En primer lugar conviene destacar los elevados porcentajes de agente activo encapsulado por las formulaciones ensayadas, superior en todos los casos al 90 %, destacando la fórmula número 5 (tabla 1), elaborada con aceite refinado de soja (0,685 g/100 ml) y lecitina de soja (1,25 g/100 ml) en relación 1/1,8 (m/m), colesterol (0,50 g/100 ml) y glicerina (2,60 g/100 ml), que incorporó un $99,48 \pm 0,36$ %.

Modificando la concentración de alguno de los componentes de la formulación como el

colecsterol (fórmulas 1,2 y 3; tabla 1) y el tween® 80 (fórmulas 1, 4 y 5; tabla 1), no se aprecian variaciones significativas en el porcentaje de principio activo encapsulado. El

Fórmula (nº)	Ivermectina encapsulada (%)
1	97,36 ± 0,86
2	91,94 ± 7,56
3	97,12 ± 1,74
4	97,26 ± 1,33
5	99,48 ± 0,36
6	95,91 ± 2,50
7	95,82 ± 2,85

Tabla 2: Resultados de la encapsulación de ivermectina en microesferas lipídicas (n= 5).

colecsterol cementa las monocapas fosfolipídicas que rodean y envuelven los glóbulos grasos y el tween® 80 es necesario para conseguir microesferas lipídicas de un tamaño lo más reducido y homogéneo posible, lo que permite su penetración a través de la cutícula de la larva de *Anisakis simplex*, incrementando con ello su eficacia.

Asimismo, el incremento de aceite de soja en la formulación supuso una reducción en el porcentaje de ivermectina captado, pasando del 97,36 ± 0,86 % que presenta la fórmula nº 1 con 0,685 g/100 ml de aceite al 95,91 ± 2,50 % de la nº 6, con doble cantidad de dicho componente.

Del mismo modo, la adición de un agente antioxidante como el acetato de DL- α -tocoferol a la fórmula nº 1, fórmula base o tipo, redujo el porcentaje encapsulado del 97,36 ± 0,86 % al 95,82 ± 2,85 %:

Se puede concluir, en base a los resultados obtenidos, que las microesferas lipídicas constituyen uno de los sistemas de transporte y liberación de fármacos con mayores posibilidades de aplicación en terapéutica para la incorporación de agentes activos de naturaleza liposoluble como es la ivermectina, debido a los elevados porcentajes de encapsulación que presentan, si se compara

con los que normalmente aportan el resto de vectores como liposomas, microesferas o nanopartículas.

Bibliografía

- Andicana, M.T., Ansotegui, I.J., Corres, L.F. and Kennedy, M.W. *Anisakis simplex*: dangerous-dead and alive. Trends in Parasitology, 18, 20 (2002).
- Tojo, J., Santamarina, M.T., Peris, D., Ubeira, F.M., Leiro, S.L. and SanMartin, M.L. In vitro effect of anthelmintics on *Anisakis simplex* survival. Japanese Journal of Parasitology, 41, 473 (1992).
- Hennesy, D.R. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. Veterinary Parasitology, 72, 367 (1997).
- Campbell, W.C., Fischer, M.H., Stapley, E.D., Albers-Schönberg, G. and Jacob, T.A. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. Science, 221, 823 (1983).
- Figueredo, C., Hernández, P.J. and Valero, A. Encapsulation of praziquantel in lipid microspheres to the treatment of anisakiasis. European Conference on Drug Delivery and Pharmaceutical Technology, Sevilla, Spain, 2004.
- Mizushima, Y. Lipid microspheres, lipid emulsions as a drug carrier-an overview. Advances in Drug Delivery Reviews, 20, 113 (1996).
- Hernández, P.J. y Cerezo, A. Microesferas portadoras de principios activos de naturaleza liposoluble. Ciencia Farmacéutica, 6, 143 (1996).
- Hernández, P.J., Medina, M.M., Cerezo, A. Y Sánchez, J. Microesferas lipídicas: método de obtención y caracterización. Pharmaklinik, 3, 163 (1989).

Autor de contacto:

Dr. Pablo José Hernández Benavides.

pabloj@ugr.es

Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Campus Universitario Cartuja, s/n.

18071-Granada (España).

Tfno.: 34-958-249546.

Fax: 34-958-248958.