

MICROENCAPSULACIÓN DE ANTIFÚNGICOS EN LIPO-SOMAS RECUBIERTOS CON ALBÚMINA

Microencapsulation of Antifungal Agents in Albumin Coated Liposomes

Sara VIRUEGA-ENCINAS; María José DE JESÚS-VALLE

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia (Salamanca). C/ Licenciado Méndez Nieto s/n. Teléf.: 923 294536.

Correo-e: mariajosedj@usal.es

RESUMEN: Antifúngicos triazólicos como el Fluconazol o el Itraconazol están siendo muy utilizados en el tratamiento y profilaxis de enfermedades fúngicas. Los liposomas son un vehículo ideal de transporte de fármacos, tanto hidrófilos como lipófilos, y sobre ellos se están estudiando estrategias, como la formación de micropartículas por recubrimiento con albúmina, que mejoren el transporte y la liberación de los fármacos. El objetivo del estudio fue evaluar y comparar la importancia del grado de unión a albúmina de Itraconazol y Fluconazol en la formulación, así como valorar la incorporación del lípido catiónico dimetildioctadecilamonio y determinar su influencia en el grado de unión de los antifúngicos. Los liposomas se prepararon mediante el método de sonicación, en ausencia de disolventes orgánicos, y fueron recubiertos con albúmina para formar las micropartículas. Mediante una técnica de cromatografía líquida de alta resolución se determinó la carga de fármaco en las mismas. La fracción de fármaco determinada en las micropartículas fue superior para el Itraconazol que para el Fluconazol. La albúmina fue capaz de solubilizar parte del Itraconazol, siendo necesaria en este caso la presencia del dimetildioctadecilamonio para la formación de las micropartículas.

Palabras clave: Liposomas; Microencapsulación; Fluconazol; Itraconazol; Albúmina.

ABSTRACT: Triazole antifungal agents as Fluconazole or Itraconazole are usual drugs for treatment and prophylaxis of fungal diseases. Liposomes are ideal vehicles for hydrophilic and lipophilic drug transport and new strategies are being studied about them in order to improve drug transport and release. The objective of the study was evaluating and comparing the importance of the grade of albumin binding of Itraconazole and Fluconazole in the formulation, as well as assessing the incorporation of a cationic lipid: dimethyldioctadecylammonium and determining its influence in the binding grade of the antifungal drugs. Liposomes were prepared using the sonication method, in absence of organic solvents, and they were albumin coated to form the microparticles. The drug concentration of them was determined by a high-performance liquid chromatography technique. The drug fraction in the microparticles was higher for Itraconazole ones. Albumin solubilized part of the Itraconazole, but in that case the presence of dimethyldioctadecylammonium is needed to microparticles forming.

Key words: Liposomes; Microencapsulation; Fluconazole; Itraconazole; Albumin.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas sistémicas son la causa hoy en día de una elevada morbimortalidad, especialmente en pacientes inmunodeprimidos. Frente a los patógenos más frecuentes, como *Candida* spp. o *Aspergillus* spp., se ha utilizado clásicamente Anfotericina B como antifúngico de referencia. Sin embargo, su elevada toxicidad limita su uso y esto ha llevado a la búsqueda de tratamientos alternativos, como los derivados azólicos, introducidos en clínica en la década de los 80 (Lass-Flörl, 2011; Carrillo-Muñoz *et al.*, 2015).

Antifúngicos triazólicos como el Fluconazol o el Itraconazol se han convertido en la primera línea del tratamiento y profilaxis de muchas de estas infecciones causadas por hongos. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima 14- α desmetilasa, que transforma el lanosterol en ergosterol. Así, estos fármacos alteran la estructura y función de la membrana mitótica e impiden la reproducción de la célula de una forma más selectiva y menos tóxica (Lass-Flörl, 2011; Carrillo-Muñoz *et al.*, 2015; Gregori-Valdés, 2005).

En la *tabla 1* se presentan las principales características de ambos fármacos.

TABLA 1. Comparación de las características del Fluconazol y del Itraconazol (Lass-Flörl, 2011; Fica, 2004; Vázquez-López, 2004; Alomrani *et al.*, 2014).

Fluconazol	Itraconazol
Hidrosoluble (1 mg/mL)	Lipófilo ($\log p > 5,5$)
Bajo grado de unión a proteínas plasmáticas (11-12%)	Alto grado de unión a proteínas plasmáticas (>98%)
Bajo peso molecular (306,30 g/mol)	Elevado peso molecular (705,64 g/mol)
Farmacocinética lineal	Farmacocinética no lineal dosis-dependiente
Bajo coste de adquisición	Mayor coste de adquisición
Inactivo frente a hongos filamentosos, resistente a algunas especies de <i>Candida</i>	Activo frente a <i>Aspergillus</i> y especies de <i>Candida</i> resistentes a Fluconazol

El Fluconazol es un antifúngico de uso habitual y muy bien tolerado que presenta escasa toxicidad y elevada biodisponibilidad (Lass-Flörl, 2011; Fica, 2004).

El Itraconazol presenta más efectos adversos, principalmente gastrointestinales, y su biodisponibilidad es baja en la presentación oral en cápsulas. Como estrategia para aumentar su solubilidad han surgido nuevas formulaciones que combinan la molécula de fármaco con un anillo de ciclodextrina. Sin embargo, las ciclodextrinas presentan algunas limitaciones: no se pueden administrar durante más de 15 días seguidos por vía parenteral y están contraindicadas en pacientes con insuficiencia renal ($CL < 30$ mL/min), entre otras. Por eso se siguen estudiando nuevas formulaciones (Lass-Flörl, 2011; Fica, 2004; Vázquez-López, 2004; Alomrani *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2008).

Los liposomas son uno de los vehículos de transporte y liberación de fármacos más prometedores en la actualidad. Se trata de vesículas de fosfolípidos formadas por una o más bicapas lipídicas concéntricas que encierran espacios acuosos, lo que les permite encapsular tanto moléculas hidrófilas como lipófilas. Son biodegradables y presentan buena biocompatibilidad y baja toxicidad (De Jesús-Valle y Sánchez-Navarro, 2015; Mufamadi *et al.*, 2011; Hua, 2015; Sercombe *et al.*, 2015).

A partir de ellos se han desarrollado estrategias que mejoran la liberación de los fármacos contenidos en su interior y evitan la rápida degradación de las vesículas lipídicas por el retículo endotelial. Un ejemplo son las micropartículas de albúmina, que están adquiriendo gran importancia en los últimos años gracias a las excelentes propiedades transportadoras de esta proteína: es biocompatible, biodegradable y estable, no presenta toxicidad ni inmunogenicidad y tiene numerosos sitios de unión con capacidad para unir varios fármacos formando una matriz (Mufamadi *et al.*, 2011; Elzoghby *et al.*, 2012).

2. OBJETIVOS

- Evaluar y comparar la importancia del grado de unión a albúmina de dos fármacos antifúngicos (Itraconazol y Fluconazol) incluidos en liposomas recubiertos con albúmina, obtenidos en ausencia de disolventes orgánicos.
- Valorar la incorporación de un lípido catiónico (DDA, dimetildioctadecilamonio) en la elaboración de dichos liposomas y determinar su influencia en el grado de unión de los antifúngicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se han llevado a cabo algunos estudios preliminares con lotes «blancos» y se han ido modificando las condiciones y el procedimiento en función de los resultados obtenidos.

Posteriormente se han preparado 8 lotes de micropartículas de albúmina cargadas con Fluconazol y 8 lotes que incluyen Itraconazol. Con cada fármaco, en 4 lotes se utilizó el lípido catiónico dimetildioctadecilamonio (lotes DDA) y en los otros 4 se prescindió del mismo (lotes EPC).

1. Preparación de las disoluciones de fármaco

Fluconazol: 1 mg/mL en agua mili-Q.

Itraconazol: se prepararon tres mezclas en agua mili-Q y se mantuvieron en agitación a 37°C durante 3-4 horas.

2. Preparación de los liposomas por el método de sonicación

Para los lotes EPC, se pesaron 0,308 g de fosfatidilcolina de huevo y 0,038 g de colesterol en un vaso de precipitados. En los lotes DDA, se pesaron 0,283 g de fosfatidilcolina, 0,025 g de dimetildioctadecilamonio y 0,038 g de colesterol.

Se añadieron poco a poco 20 mL de la disolución de Fluconazol (o 20 mL de agua mili-Q para los lotes de Itraconazol) precalentada a 60°C y se agitó hasta obtener una dispersión homogénea de los lípidos.

Dicha dispersión se colocó en un baño de ultrasonidos precalentado a 60°C, donde se mantuvo 20 minutos. Después se agitó y se dejó en reposo durante 60 minutos, a temperatura ambiente y protegido de la luz.

3. Encapsulación de los liposomas con albúmina y formación de las micropartículas

Se colocaron 5 mL de la suspensión de liposomas en frascos de vidrio y se mantuvieron durante 30 minutos en nevera.

En agitación mecánica, se añadieron gota a gota 5 mL de una disolución de albúmina bovina preparada en agua mili-Q al 1%. En el caso del Itraconazol, se añadieron 5 mL de la disolución de albúmina-Itraconazol. Después de ajustar el pH a 4 en los lotes EPC, se mantuvo la agitación de la mezcla durante 15 minutos, a temperatura ambiente.

Transcurrido ese tiempo, se llevaron al baño de incubación, donde se mantuvieron a 4°C durante 20 horas a una velocidad de 30 rpm, protegidos de la luz con papel de aluminio.

A las 20 horas, se observó el floculado formado y se homogeneizó agitando suavemente. Se centrifugaron 4 mL en tubos Eppendorf en una centrífuga refrigerada a 15000 rpm y 4°C durante 30 minutos. Se retiró el sobrenadante y se midió el volumen.

4. Observación al microscopio óptico

Tras la realización de los lotes, se observaron al microscopio óptico (Leyca®) y se realizaron capturas con la cámara incorporada.

5. Determinación de la carga de fármaco

Se determinó la carga de fármaco presente en las micropartículas mediante una técnica de HPLC: cromatografía líquida de alta resolución. Se utilizó una fase móvil compuesta por 50% de agua mili-Q y ácido fórmico al 0.1% y 50% de acetonitrilo grado HPLC. Como fase estacionaria, se utilizó una columna Purospher® STAR RP-18 endcapped (3 µm) y se trabajó con detección ultravioleta a una longitud de onda de 261 nm.

El tratamiento de la muestra consistió en la resuspensión de los pellets en 1 mL de acetonitrilo para la extracción del fármaco y agitación en vortex durante 1 minuto. Posteriormente se filtraron las muestras con filtros de acetato de celulosa para clarificarlas y se inyectó un volumen de 10 µL. Los sobrenadantes fueron inyectados directamente en el equipo. Inyector: Waters 2695. Detector: Waters 2998 (Photodiode Array Detector).

La fracción de fármaco libre (%) se calculó como la proporción de la cantidad de fármaco presente en las micropartículas y detectada por HPLC con respecto a la cantidad de fármaco incluida inicialmente. La fracción de fármaco unida (%) es la incluida dentro de los liposomas, que no es detectada por el HPLC; se calculó por diferencia. La cantidad de fármaco en el *pellet* se determinó teniendo en cuenta el volumen de las muestras de las que partíamos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la preparación de los lotes de micropartículas se observó cómo influye el diferente comportamiento de Itraconazol y Fluconazol en las formulaciones.

Como se puede ver en las *tablas 2 y 3*, la fracción de fármaco libre (%) determinada en las micropartículas es superior para el Itraconazol, comparado con los valores obtenidos para el Fluconazol:

- Itraconazol-EPC: $24,50 \pm 1,72\%$.
- Itraconazol-DDA: $25,14 \pm 2,39\%$.
- Fluconazol-EPC: $4,95 \pm 2,15\%$.
- Fluconazol-DDA: $6,11 \pm 1,97\%$. Se ha despreciado el lote 3 ya que sus resultados se desvían mucho y seguramente se deba a algún error cometido en el proceso.

En los lotes de Fluconazol la mayoría del fármaco ha quedado en el sobrenadante, por lo que la fracción de fármaco unida (%) es despreciable.

TABLA 2. Resultados obtenidos en la determinación de Itraconazol
 (L.D. límite de detección de la técnica de HPLC: 0,1 µg/mL).

MUESTRA IT	CANTIDAD PELLET (mg)	CANTIDAD SOBRENADANTE (mg)	FRACCIÓN DE FÁRMACO LIBRE (%)	FRACCIÓN DE FÁRMACO UNIDA (%)
EPC1A	0,49	<L.D.	24,37	75,63
EPC1B	0,47	<L.D.	23,36	76,64
EPC2A	0,54	<L.D.	26,90	73,10
EPC2B	0,53	<L.D.	26,50	73,50
EPC3A	0,45	<L.D.	22,35	77,65
EPC3B	0,49	<L.D.	24,55	75,45
EPC4A	0,51	<L.D.	25,50	74,50
EPC4B	0,45	<L.D.	22,50	77,50
			24.50	75.50
			±1,72	±1,72
DDA1A	0,47	<L.D.	23,46	76,54
DDA1B	0,48	<L.D.	23,91	76,09
DDA2A	0,56	<L.D.	27,77	72,23

MUESTRA IT	CANTIDAD PELLET (mg)	CANTIDAD SOBRENADANTE (mg)	FRACCIÓN DE FÁRMACO LIBRE (%)	FRACCIÓN DE FÁRMACO UNIDA (%)
DDA2B	0,56	<L.D.	28,02	71,98
DDA3A	0,55	<L.D.	27,35	72,65
DDA3B	0,52	<L.D.	25,82	74,18
DDA4A	0,46	<L.D.	22,81	77,19
DDA4B	0,44	<L.D.	22,00	78,00
			25,14	74,86
			±2,39	±2,39

TABLA 3. Resultados obtenidos en la determinación de Fluconazol.

MUESTRA FLC	VOLUMEN SOBRENADANTE (mL)	CANTIDAD FLC SOBREN. (mg)	CANTIDAD FLC PELLET (mg)	FRACCIÓN DE FÁRMACO LIBRE (%)
EPC1A	4,10	2,43	0,07	2,91
EPC1B	4,20	2,44	0,06	2,56
EPC2A	4,30	2,38	0,12	4,88
EPC2B	4,40	2,42	0,08	3,20
EPC3A	4,20	2,29	0,21	8,44
EPC3B	4,30	2,31	0,19	7,64
EPC4A	4,20	2,37	0,13	5,08
EPC4B	4,60	2,38	0,12	4,87
				4,95
				± 2,15
DDA1A	4,40	2,38	0,12	4,61
DDA1B	4,40	2,38	0,12	4,96
DDA2A	4,20	2,32	0,18	7,10
DDA2B	4,30	2,39	0,11	4,54
DDA3A	4,40	1,90	0,60	-
DDA3B	4,30	1,90	0,60	-
DDA4A	4,10	2,35	0,15	5,86
DDA4B	4,20	2,26	0,24	9,62
				6,11
				± 1,97

El Itraconazol presenta una baja solubilidad acuosa que dificulta el trabajo en ausencia de disolventes orgánicos. Se eligió la mezcla B porque en ella el exceso de albúmina consiguió solubilizar más cantidad de fármaco que en las mezclas A y C. Se observó que dejando la mezcla en estas condiciones durante más tiempo, la solubilidad del Itraconazol puede aumentar, por lo que este podría ser un buen punto de partida para futuras investigaciones.

En el caso del Fluconazol, aunque es hidrosoluble, su baja afinidad por la albúmina es lo que dificulta su encapsulación en las micropartículas.

Mientras que para el Fluconazol el floculado de micropartículas es más compacto, para el Itraconazol es más esponjoso y ocupa más volumen. Mientras el sobrenadante del Fluconazol es prácticamente transparente, el del Itraconazol es amarillento, similar al color que tenía la disolución de Itraconazol y albúmina.

Tras la observación al microscopio óptico de los lotes con Itraconazol, se aprecia que las partículas formadas en el floculado son más grandes que en el caso del Fluconazol y se ven agregados que pueden ser complejos Itraconazol-albúmina.

Respecto a las diferencias entre los lotes EPC y DDA, se observó cómo aquellos que tienen el lípido catiónico DDA forman un floculado más compacto. En estos lotes se produce una atracción entre la carga negativa de la albúmina y las cargas positivas que adquieren los liposomas por estar unidos al DDA. Esta atracción es mayor, en valor absoluto, que la producida entre la carga negativa de las cabezas de los liposomas sin DDA y la carga positiva de la albúmina a pH 4, por debajo de su punto isoeléctrico. Por eso en los lotes EPC, que no tienen lípido catiónico, el floculado es menos compacto y se redispersa fácilmente.

En el caso concreto del Itraconazol, en los lotes EPC no se ha formado un *pellet* separable por centrifugación en el que sea posible caracterizar las partículas. Se trata más bien de un precipitado de aspecto gelatinoso y turbio. Además, se ven partículas en suspensión, menos densas, que pueden corresponder con el exceso de albúmina que no tiene liposomas suficientes para unirse. Habría que analizar estas partículas, ya que también se podría tratar de complejos albúmina-Itraconazol que pueden ser interesantes para futuras investigaciones.

En el caso del Fluconazol, aunque el *pellet* se forma perfectamente tanto con DDA como sin él, en la *tabla 3* se aprecia una ligera mayor proporción de fármaco en las micropartículas en los lotes en los que se añadió el lípido catiónico.

En todas estas formulaciones, la albúmina parece actuar como una matriz que engloba a los liposomas en su interior. Sin embargo, necesitaríamos realizar una espectroscopía RAMAN (técnica fotónica de alta resolución) que nos proporcione información química y estructural para saber cómo es realmente la morfología de las partículas formadas. También sería necesario realizar a continuación estudios para determinar el tamaño de las partículas formadas, así como ensayos de cesión de fármaco.

5. CONCLUSIONES

La fracción de fármaco determinada en las micropartículas es superior para el Itraconazol que para el Fluconazol.

Un exceso de albúmina es capaz de solubilizar parte del Itraconazol debido a su alto grado de unión a proteínas plasmáticas, a pesar de ser un fármaco insoluble en agua.

En las formulaciones de Itraconazol, para las condiciones estudiadas, es necesaria la presencia del lípido catiónico DDA para que se forme el floculado con las micropartículas.

En la formulación de Fluconazol, la presencia del DDA aumenta ligeramente el contenido de fármaco en los liposomas recubiertos con albúmina, comparado con la formulación sin lípido catiónico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alomrani AH, Shazly GA, Amara AA, Badran MM. Itraconazole-hydroxypropyl- β -cyclodextrin loaded deformable liposomes: in vitro skin penetration studies and antifungal efficacy using *Candida albicans* as model. *Colloid Surface B*. 2014; 121:74-81.
- Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Arechavala A, Tur-Tur C, Eraso E, Jauregizar N, Quindós G, Negroni R. La utilidad clínica de los derivados triazólicos en el tratamiento de las infecciones fúngicas. *RevEspQuimioter*. 2015; 28(4):169-182.
- Chen W, Gu B, Wang H, Pan J, Lu W, Hou H. Development and evaluation of novel itraconazole-loaded intravenous nanoparticles. *Int J Pharm*. 2008; 362(1-2):133-140.
- De Jesús-Valle MJ, Sánchez-Navarro A. Liposomes Prepared in Absence of organic solvents: sonication versus lipid film hydration method. *Curr Pharm Anal*. 2015; 11(2):86-91.
- Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release*. 2012; 157(2):168-182.
- Fica A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. Parte I: Fluconazol, itraconazol y voriconazol. *RevChilInfect*. 2004; 21:28-38.
- Gregorí-Valdés BS. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm*. 2005; 39(2).
- Hua S. Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. *Front Pharmacol*. 2015; 6:219.
- Lass-Flörl C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. *Drugs*. 2011; 71(18):2405-2419.
- Mufamadi MS, Pillay V, Choonara YE, Du Toit LC, Modi G, Naidoo D, Ndesendo VMK. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *J Drug Deliv*. 2011; 2011:93985.
- Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front Pharmacol*. 2015; 6:286.

Vázquez-López L. Importancia clínica de los azoles en la terapia antifúngica: tratamiento o profilaxis con los nuevos azoles en hematología. *RevEspQuimioterap.* 2004; 17(1): 98-100.