

MICROENCAPSULACIÓN DE CIPROFLOXACINO EN MICROESFERAS DE ALBÚMINA Y LIPOSOMAS (ALBUSOMAS)

Microencapsulation of Ciprofloxacin in Microspheres of Albumin and Liposomes (Albusomes)

Juan José DUQUE AGUILAR; M.^a José de JESÚS VALLE, Amparo SÁNCHEZ NAVARRO
Departamento de Ciencias Farmacéuticas (Farmacia y Tecnología Farmacéutica).
Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno,
C/Licenciado Méndez Nieto s/n, 37007 (Salamanca) Tél.: 923294536
Correo-e: asn@usal.es

RESUMEN: Las fluoroquinolonas son agentes bactericidas de amplio espectro indicadas para el tratamiento de múltiples patologías infecciosas. Los liposomas constituyen excelentes vehículos farmacológicos capaces de modular el perfil de liberación del principio activo encapsulado. La albúmina presenta elevada capacidad de unión y transporte de solutos. El objetivo del presente estudio ha sido incorporar ciprofloxacino a formulaciones basadas en la combinación de liposomas y albúmina para aunar las ventajas de ambos en un vehículo farmacéutico.

La preparación de los liposomas se llevó a cabo mediante sonicación en ausencia de disolventes orgánicos, empleando distintas disoluciones de ciprofloxacino. Para la formación de los albusomas se empleó albúmina sérica bovina. Se evaluó la influencia de tres variables en la eficacia de encapsulación: presencia o ausencia de componentes catiónicos en los liposomas, concentración de ciprofloxacino y concentración de albúmina; se cuantificó el antibiótico mediante una técnica de HPLC.

Los resultados obtenidos indican que la composición de los liposomas influye significativamente sobre la eficacia de encapsulación obtenida y que la concentración de ciprofloxacino no afecta a este parámetro.

Palabras clave: liposomas; ciprofloxacino; albúmina; microencapsulación.

ABSTRACT: Fluoroquinolones are bactericidal agents showing a broad antimicrobial spectrum used for several infectious diseases. Liposomes are excellent carriers for controlled drug delivery and albumin shows a great capacity for binding and transport of solutes. The aim of this study was to incorporate ciprofloxacin into a formulation based on the combination of liposomes and albumin in order to gather the advantages of both components into a single pharmaceutical vehicle.

Liposomes were prepared by sonication, in absence of organic solvents, by using ciprofloxacin solutions of different concentration. The albusomes were prepared by mixing these with bovine serum albumin. The influence of three variables on the drug encapsulation efficiency was evaluated: liposomes composition, ciprofloxacin concentration and albumin amount; an HPLC technique was used for drug quantification.

The results of the study reveal that liposomes composition significantly affects the entrapment efficiency registered while ciprofloxacin concentration does not affect this parameter.

Key words: liposomes; ciprofloxacin; albumin; microencapsulation.

1. INTRODUCCIÓN

Ciprofloxacin es una fluoroquinolona de segunda generación de amplio espectro, activa frente a microorganismos aerobios Gram-negativos y Gram-positivos. Debido a la baja toxicidad asociada a su uso y el lento desarrollo de resistencias está indicado en el tratamiento de diversas infecciones.

Los liposomas son estructuras vesiculares compuestas por una o varias bicapas de naturaleza fosfolipídica que encierran en su interior el mismo número de compartimentos acuosos, presentando un rango de tamaños que oscila entre 20 nm y 10 µm. Suponen un excelente vehículo farmacológico con capacidad de modular y controlar la liberación del principio activo albergado, permitiendo el diseño de formulaciones versátiles provistas de múltiples ventajas en el campo de la terapéutica (Allen *et al.* 2013).

La encapsulación de ciprofloxacin en estructuras liposomales podría solventar algunas limitaciones de la formulaciones convencionales, mejorando la eficacia y seguridad de los tratamientos (Bakker-Woudenberg *et al.* 2001). Entre las ventajas que supone la encapsulación de ciprofloxacin se encuentran: modulación de la liberación y disminución del aclaramiento, manteniendo concentraciones plasmáticas y tisulares de manera prolongada; favorecer la interacción con determinados tejidos facilitando el alcance de la biofase y penetración a espacios infectados; en

definitiva, aumentar la eficacia y resolución del proceso infeccioso, con disminución de la toxicidad y mejora de la tolerancia al tratamiento.

Se han ensayado distintas formulaciones de ciprofloxacino liposomal mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, cobrando especial importancia aquellas relacionadas con la administración por vía pulmonar para el tratamiento de patologías infecciosas a nivel local (Cipolla *et al.* 2014) y con el desarrollo y diseño de formas de dosificación ocular con la finalidad de superar las limitaciones de formulaciones convencionales (Budai *et al.* 2007).

Las vesículas liposomales pueden ser dotadas de un recubrimiento con finalidad protectora y/o moduladora de sus propiedades, en función del agente seleccionado. La albúmina sérica es la proteína transportadora más abundante en plasma sanguíneo, ampliamente estudiada y con capacidad de unión a múltiples ligandos. Por sus características supone una herramienta en la modulación del perfil farmacocinético de diversos agentes terapéuticos (Bairagi *et al.* 2015). En el presente estudio se consideró la posibilidad de combinar en un mismo sistema ambas tecnologías: la encapsulación en liposomas y el recubrimiento de estos con albúmina, aplicándolo a formulaciones de ciprofloxacino.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

L- α -fosfatidilcolina de huevo (EPC), colesterol (Ch), dimetildioctadecil amonio bromuro (DDA), ciprofloxacino HCl (CPX) y albúmina sérica bovina fueron adquiridos a Sigma-Aldrich Química S.A.; agua ultrapura Milli-Q®.

Miniequipo de ultrasonidos ATU®, serie ATM; equipo Millipore Milli-Q® Gradiente A10; baño con agitación Unitronic Vaivén C; ultracentrífuga refrigerada Kontron Centrikon®; equipo de microscopía óptica Zeiss; cromatógrafo y detector de fluorescencia acoplado Shimadzu.

Preparación de liposomas (método de sonicación)

Se pesan las cantidades necesarias de fosfatidilcolina (EPC), colesterol (Ch) y dimetildioctadecil amonio bromuro (DDA), en el caso de que este último se incluya en la formulación. A continuación se dispersan los componentes mediante agitación mecánica vigorosa en un volumen de 20 mL de una disolución de ciprofloxacino (CPX) de concentración conocida (1 mg/mL, 2,5 mg/mL ó 5 mg/mL) previamente precalentada a unos 55-60°C. Se traslada dicha dispersión a un baño de ultrasonidos (50 Hz) durante 20 min a 60°C. Finalmente la suspensión resultante se mantiene a temperatura ambiente para su estabilización durante 60 min.

Encapsulación y obtención de micropartículas

La suspensión de liposomas obtenida mediante el procedimiento descrito anteriormente se enfría a 4-6°C durante 30 min. Seguidamente se añade el mismo volumen de una disolución de albúmina de concentración conocida (0,5% p/v o 1% p/v) gota a gota, favoreciendo el mezclado mediante agitación. La mezcla resultante, previo ajuste de pH a un valor de 4 en ausencia de componente catiónico, se traslada a un baño provisto de agitación por vaivén a 30 oscilaciones por minuto y 4°C (con rampa de temperatura inicial) durante un periodo de 20 h. Finalizado dicho periodo las muestras se trasladan a una centrifuga programada a 15000 rpm y 4°C durante un periodo no inferior a 30 min para obtener un sobrenadante limpio, libre de partículas, y un *pellet* compacto que incluye las partículas formadas.

Cuantificación de principio activo

La determinación de la concentración de ciprofloxacino en sobrenadante se realiza mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con fase móvil compuesta por ácido fórmico 0,1% (ajustado con TEA, pH 3,5) y metanol (en proporción 80:20), y fase estacionaria no polar en columna Purospher® STAR RP-18 endcapped (3 µm) LiChroCART® 55-4. Para la cuantificación se acopla un detector de fluorescencia ($\lambda = 277$ nm) al cromatógrafo. Muestras y patrones son sometidos a las mismas condiciones: dilución 1/10 y adición de reactivo precipitante (ácido tricloroacético 10%).

Determinación de la eficacia de encapsulación

A partir de la cantidad de principio activo añadida y la cuantificada en el sobrenadante se determina la cantidad retenida en las micropartículas y, de este modo, la eficacia de encapsulación (EE) de las mismas mediante la siguiente fórmula:

$$EE(\%) = \frac{Q_{\text{ciprofloxacino en partículas}}}{Q_{\text{ciprofloxacino total}}} \times 100$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de liposomas

Se prepararon un total de 24 lotes de liposomas cargados de ciprofloxacino, presentando diferencias en la composición de la bicapa que conforma las vesículas y la concentración de la disolución de principio activo empleada. El análisis

microscópico muestra una distribución de tamaños homogénea, observándose un descenso leve de tamaño en aquellos lotes que incluyen en su composición el componente iónico, debido posiblemente a fenómenos electrostáticos entre componentes.

Encapsulación y obtención de micropartículas

La mezcla de albúmina y liposomas (con o sin DDA) origina floculado y separación de fases con formación de partículas constituidas por liposomas atrapados en una matriz de albúmina libre y unida al fármaco, mostrando diámetros de partícula $\geq 5 \mu\text{m}$. La separación de las partículas se consigue mediante centrifugado, observando en aquellos lotes cuyos liposomas carecen de componente catiónico una separación más deficiente de los *pellet* resultantes. El análisis de estos últimos muestra leves diferencias en el nivel de consistencia de los mismos, posiblemente debido a interacciones más débiles entre liposomas y albúmina cuanto mayor es la concentración de fármaco.

Determinación de la eficacia de carga

La tabla 1 muestra los valores medios de EE obtenidos para las distintas condiciones experimentales ensayadas.

TABLA 1. Valores de EE en función de las distintas condiciones ensayadas durante el estudio.

Lote (nº)	C _{ciprofloxacino} (mg/mL)	C _{albúmina} (g/100mL)	EE DDA (-) (%)	EE DDA (+) (%)
1 – 4	5	1	13,43 ± 6,52	–
5 – 8	2,5	1	12,47 ± 6,67	–
9 – 12	1	1	13,95 ± 5,76	–
13 – 16	5	1	–	32,46 ± 9,82
17 – 20	2,5	1	–	19,72 ± 5,68
21 – 24	1	1	–	31,35 ± 1,00
1 – 4	5	0,5	10,30 ± 4,84	–
5 – 8	2,5	0,5	6,90 ± 0,85	–
9 – 12	1	0,5	11,52 ± 4,73	–
13 – 16	5	0,5	–	29,25 ± 12,12
17 – 20	2,5	0,5	–	13,67 ± 1,50
21 – 24	1	0,5	–	26,83 ± 5,53

El resultado más relevante es el correspondiente a la influencia de la composición de la bicapa lipídica en la EE, que es significativamente mayor para los liposomas que incluyen el componente catiónico. La EE se incrementa más de un 100% para los tres niveles de concentración del fármaco y los dos valores de concentración de albúmina cuando los liposomas contienen DDA en la bicapa lipídica. Por el contrario, no se encuentra correlación entre la concentración de ciprofloxacino y la EE obtenida.

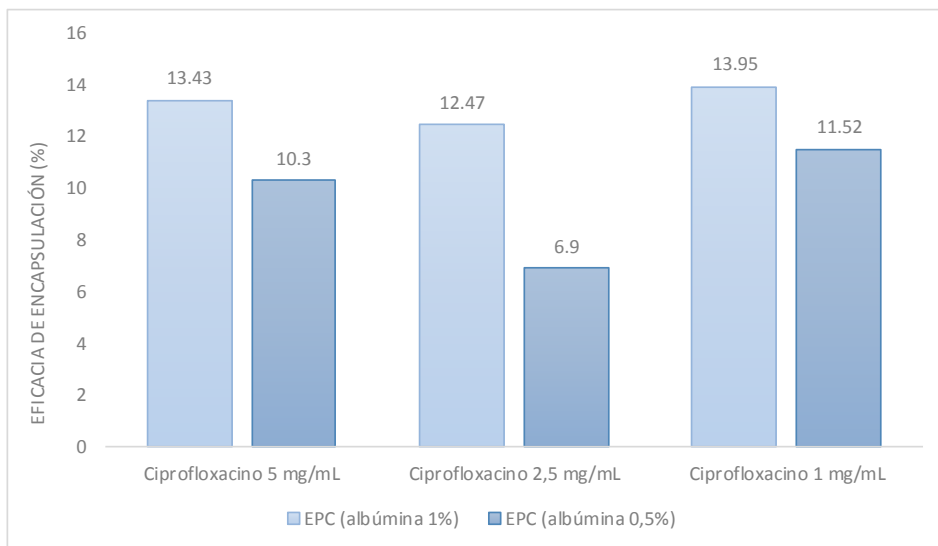


FIGURA 1. Porcentaje medio de encapsulación en función de la concentración de principio activo y la concentración de albúmina aplicada, en ausencia de componente catiónico en la bicapa lipídica.

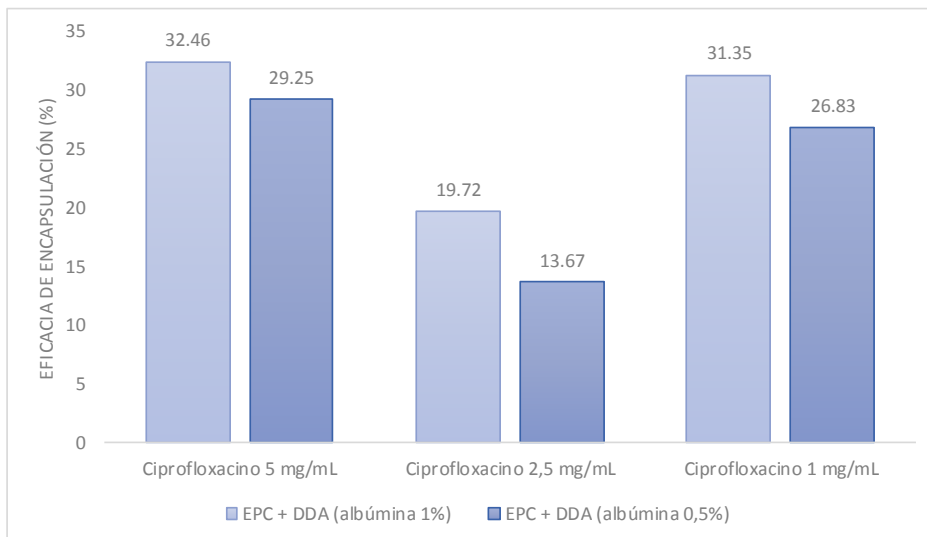


FIGURA 2. Porcentaje medio de encapsulación en función de la concentración de principio activo y la concentración de albúmina aplicada, en presencia de componente catiónico en la bicapa lipídica.

En cuanto a la influencia de la albúmina, se aprecia una tendencia al aumento de EE para el valor más alto de proteína, aunque las diferencias no son significativas para los tres niveles de fármaco estudiados. Las figuras 1 y 2 ilustran estos resultados.

4. CONCLUSIONES

El desarrollo de formulaciones basadas en sistemas liposomales en el tratamiento de patologías infecciosas muestra una extensa bibliografía a lo largo de las dos últimas décadas. La combinación de esta tecnología con las propiedades y beneficios de la albúmina supone un nuevo horizonte a investigar.

Se observa una relación directa entre la eficacia de encapsulación y la composición de las bicapas lipídicas, concretamente la presencia de componentes de naturaleza catiónica (DDA) incrementa considerablemente la carga de fármaco.

No se encuentra correlación entre la concentración de ciprofloxacin empleada en el procedimiento y la eficacia de encapsulación de las partículas obtenidas.

Las partículas obtenidas muestran tamaños $\geq 5 \mu\text{m}$, no siendo posible su inclusión en formulaciones parenterales, pero sí destinadas a su administración pulmonar, nasal y ocular, entre otras.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013; 65(1): 36-48.
- Bairagi U, Mittal P, Mishra B. Albumin: a versatile drug carrier. *Austin Therapeutics.* 2015; 2(2): 1021.
- Bakker-Woudenberg IA, ten Kate MT, Guo L, Working P, Mouton JW. Improved efficacy of ciprofloxacin administered in polyethylene glycol-coated liposomes for treatment of *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45(5): 1487-1492.
- Bakker-Woudenberg IA, ten Kate MT, Guo L, Working P, Mouton JW. Ciprofloxacin in polyethylene glycol-coated liposomes: efficacy in rat models of acute or chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(8): 2575-2581.
- Budai L, Hajdú M, Budai M, Gróf P, Béni S, Noszál B *et al.* Gels and liposomes in optimized ocular drug delivery: studies on ciprofloxacin formulations. *Int. J. Pharm.* 2007; 343(1-2): 34-40.
- Cipolla D, Wu H, Gonda I, Chan HK. Aerosol performance and long-term stability of surfactant-associated liposomal ciprofloxacin formulations with modified encapsulation and release properties. *AAPS PharmSciTech.* 2014; 15(5): 1218-1227.
- Cipolla D, Wu H, Gonda I, Eastman S, Redelmeier T, Chan HK. Modifying the release properties of liposomes toward personalized medicine. *J. Pharm. Sci.* 2014; 103(6): 1851-1862.
- Hamblin KA, Wong JP, Blanchard JD, Atkins HS. The potential of liposome-encapsulated ciprofloxacin as a tularemia therapy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4:79.
- Hosny KM. Ciprofloxacin as ocular liposomal hydrogel. *AAPS PharmSciTech.* 2010; 11(1): 241-246.
- 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.
- Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J. Control. Release.* 2008; 132(3): 171-183.
- Mehravar R, Jahanshahi M, Saghatoleslami N. Human serum albumin (HSA) nanoparticles as drug delivery system: preparation, optimization and characterization study. *Dyn Biochem Process Biotechnol Mol Biol.* 2009; 3(Special Issue 2): 51-56.
- Norville IH, Hatch GJ, Bewley KR, Atkinson DJ, Hamblin KA, Blanchard JD *et al.* Efficacy of liposome-encapsulated ciprofloxacin in a murine model of Q fever. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(9): 5510-5518.
- Serisier DJ, Bilton D, De Soyza A, Thompson PJ, Kolbe J, Greville HW *et al.* Inhaled, dual release liposomal ciprofloxacin in non-cytic fibrosis bronchiectasis (ORBIT-2): a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *Thorax.* 2013; 68(9): 812-817.
- Taha EI, El-Anazi MH, El-Bagory IM, Bayomi MA. Design of liposomal colloidal systems for ocular delivery of ciprofloxacin. *Saudi Pharm. J.* 2014; 22(3): 231-239.