

ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <https://doi.org/10.14201/fj202272717>

LIOFILIZACIÓN DE LIPOSOMAS PARA SU ADMINISTRACIÓN PULMONAR

Lyophilization of Liposomes for Pulmonary Administration

Blanca CALDERÓN GARCÍA; María José DE JESÚS VALLE

Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Área Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno.
Correo-e: mariajosedj@usal.es

Grupos colaboradores: Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca
(IBSAL)

RESUMEN: El citrato de sildenafil se ha convertido, en los últimos años, en un agente terapéutico oral utilizado para el tratamiento de la hipertensión arterial. Debido a que presenta ciertas limitaciones, como una reducción significativa de la biodisponibilidad oral y de la actividad farmacológica debido al metabolismo hepático de primer paso, se han propuesto formulaciones innovadoras para su administración por vía pulmonar, permitiendo minimizar los efectos adversos sistémicos y el efecto de primer paso.

El objetivo del trabajo es elaborar liposomas cargados de sildenafil y posteriormente liofilizarlos. Además, evaluar las propiedades de flujo del producto sólido obtenido para su posible administración por vía pulmonar.

Los liposomas obtenidos fueron preparados mediante el método de sonicación-filtración, en ausencia de disolventes orgánicos y, por tanto, se consideran unos sistemas biocompatibles y biodegradables, muy adecuados para su posible administración por vía pulmonar. Presentaron una elevada eficacia de encapsulación de sildenafil (EE% = 85).

Se observaron adecuados resultados de flujo del producto sólido con cada uno de los lioprotectores utilizados, obteniéndose valores de ángulo de reposo inferiores a 30° e índices de Carr (IC) también inferiores al 36 %.

Por tanto, la liofilización de liposomas juega un papel fundamental en la conservación y la estabilidad de dichas vesículas.

Palabras clave: liposomas; liofilización; administración pulmonar; sildenafilo.

ABSTRACT: Sildenafil citrate has become, in recent years, an oral therapeutic agent used for the treatment of arterial hypertension. Because it has certain limitations, such as a significant reduction in oral bioavailability and pharmacological activity due to first-pass hepatic metabolism, innovative formulations have been proposed for pulmonary administration. This allows minimising systemic adverse effects and the first-pass effect.

The aim of the work is to elaborate sildenafil-loaded liposomes and subsequently lyophilise them. Furthermore, to evaluate the flow properties of the solid product obtained for possible pulmonary administration.

The liposomes obtained were prepared using the sonication-filtration method, in the absence of organic solvents, and are therefore considered to be biocompatible and biodegradable systems, highly suitable for possible pulmonary administration. They showed high sildenafil encapsulation efficiency (EE% = 85).

Adequate solid product flow results were observed with each of the lyoprotectants used, obtaining angle of repose values below 30° and Carr's index (CI) also below 36 %.

Therefore, lyophilisation of liposomes plays a fundamental role in the preservation and stability of these vesicles.

Keywords: liposomes; lyophilization; pulmonary administration; sildenafil.

1. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una patología poco frecuente donde los valores de presión arterial pulmonar media son superiores a 25 mmHg en reposo y 30 mmHg durante el ejercicio.

Su desarrollo está vinculado a una disfunción del endotelio vascular pulmonar debido a una proliferación y apoptosis celular anormal. Como consecuencia de

dicha disfunción, se originan fenómenos fisiopatológicos tales como vasoconstricción, trombosis e hiperproliferación celular (Rosas *et al.*, 2006).

Entre los fármacos susceptibles de ser usados en el tratamiento de la hipertensión pulmonar, encontramos el citrato de sildenafil. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición selectiva de la fosfodiesterasa 5 (PDE-5), una enzima ampliamente distribuida en el tejido pulmonar cuya inhibición aumentará el efecto vasodilatador pulmonar de prostaciclina y óxido nítrico (ON), además de actuar sobre el ventrículo derecho (Beltrán-Gómez *et al.*, 2015).

En los últimos años el sildenafil se ha convertido en un agente terapéutico oral de primera línea para algunos pacientes, pero al presentar ciertas limitaciones, como una reducción significativa de la biodisponibilidad oral y la actividad farmacológica debido al metabolismo hepático de primer paso, se han propuesto formulaciones más innovadoras por vía pulmonar (Barnett, Machado, 2006; Gaspar *et al.*, 2008; Zakharova *et al.*, 2021).

Entre las ventajas que presenta la vía pulmonar encontramos que es una ruta no invasiva, el proceso de absorción está favorecido por la gran superficie pulmonar, el epitelio alveolar es muy delgado y la zona está altamente irrigada. Además, se minimizan los efectos adversos sistémicos y el efecto de primer paso (Haque *et al.*, 2016).

Dadas sus características fisicoquímicas sería interesante la inclusión del citrato de sildenafil en formulaciones liposomales (Gavira Heredia, 2020).

Los liposomas son estructuras vesiculares micro- o nanoscópicas constituidas por una o más bicapas lipídicas concéntricas que encierran un número igual de compartimentos acuosos (Navarro, 2008).

Su pequeño tamaño, una composición similar a la de las membranas celulares y su capacidad de encapsulación de diferentes tipos de principios activos hacen a los liposomas eficaces sistemas transportadores de fármacos en el organismo (Suñé Negre).

Además, son capaces de liberar de manera controlada y sostenida los fármacos, evitando los “picos altos” asociados a los efectos secundarios y reduciendo la dosis necesaria para mantener los niveles terapéuticos. En consecuencia, es probable que la inhalación de fármacos encapsulados en liposomas produzca perfiles cinéticos más seguros y eficaces que la inhalación de fármacos libres (De Jesús Valle, 2018).

En este trabajo nos centraremos en la liofilización de liposomas. Esta técnica permite eliminar el agua de un producto por sublimación aplicando vacío, previa exposición a temperaturas por debajo de su punto de congelación (Saharan, 2017).

Según algunos estudios, la liofilización de las formulaciones liposomales para administración pulmonar resultaría ventajosa pues así se conseguiría reducir la viscosidad del producto, asemejándose a la del surfactante endógeno. Por otra parte, también evitaría la pérdida de fármaco y la fusión/agregación de vesículas,

así como proteger la bicapa lipídica de la oxidación (Blanco *et al.*, 2008; De Jesús Valle *et al.*, 2021).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es la elaboración de liposomas cargados de sildenafilo, mediante el método de sonicación y gradiente de pH.

Se caracterizará y evaluará la incorporación de diferentes lioprotectores en la obtención del producto sólido liofilizado.

Además, se evaluarán las propiedades de flujo del producto sólido y liofilizado obtenido para su posible administración por vía pulmonar.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. *Material*

- *Reactivos*: Ácido clorhídrico, agua ultrapura Mili-Q, colesterol, citrato de sildenafilo (CS), fosfatidilcolina, hidróxido sódico, lactosa, manitol, tampón citrato pH = 4,7.
- *Equipos*: Balanza de precisión Mettler Toledo, baño de ultrasonidos ATU serie ATM 40-6 LCD, baño de incubación con agitación Unitronic OR, filtros CHROMAFIL® de 0,45 µm, liofilizador, pH-metro serie s-619L Peak instruments, turbidímetro portátil Hach 2100Q, volumenómetro ERWEKA para determinar la densidad, equipo para la determinación de humedad residual (Karl-Fisher).

3.2. *Métodos*

- *Preparación de liposomas por sonicación*

Se pesan fosfatidilcolina y colesterol y se mezclan en un vaso de precipitados. Seguidamente, se incorpora el citrato de sildenafilo previamente disuelto en el tampón citrato a pH 4,7 bajo agitación constante con varilla de vidrio hasta conseguir una dispersión homogénea de los lípidos.

El contenido del vaso se transfiere a un balón de vidrio, que se lleva a un baño de ultrasonidos a 40 ± 2 °C durante 20 minutos. A continuación, se retira el balón del baño y se filtra su contenido a través de filtros de 0,45 µm.

El filtrado se almacena en envase topacio a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente se refrigera otra hora. Una vez formados los liposomas, se aplica el gradiente de pH por adición de NaOH hasta pH 7 con objetivo de optimizar el proceso de encapsulación.

La mezcla se introduce en un baño a 4 °C durante 20 horas para conseguir que el citrato de sildenafilo, en su forma molecular, difunda a través de la bicapa lipídica, quedando atrapado en el interior del liposoma en su forma ionizada.

- *Incorporación de diferentes cantidades de etanol*

Con el objetivo de mejorar las propiedades de flujo y esponjosidad del sólido, obtenido por liofilización, se añadieron lentamente pequeñas cantidades de etanol a los liposomas (0,1, 0,25 y 0,5 %).

En los estudios preliminares se incorporaron concentraciones de hasta el 1 % de etanol, pero tras la inspección visual se decidió descartar las tortas con concentraciones superiores al 0,5 % dado que no presentaban la porosidad buscada.

- *Liofilización*

Los liposomas obtenidos se dividieron en distintos lotes incorporando distintas concentraciones de lioprotectores.

Las muestras se congelaron en viales y bandejas a -80 °C durante 20 horas. Se llevó a cabo una desecación en el liofilizador durante 48 horas a -20 °C.

- *Caracterización de liposomas*

- **Eficacia de encapsulación (EE)**

Para determinar la cantidad de CS encapsulado se toman dos alícuotas del preparado. Una de ellas se analiza directamente para conocer la concentración total de CS mientras que la otra se somete a centrifugación para posteriormente cuantificar la concentración de CS que permanece en el sobrenadante. La diferencia de ambas corresponde a la concentración de CS encapsulado.

$$EE (\%) = \frac{CS \text{ total} - CS \text{ sobrenadante}}{CS \text{ total}} * 100$$

- **Turbidez**

La turbidimetría es una técnica espectroscópica que permite estudiar los agregados lipídicos y estimar sus tamaños. Aunque con este procedimiento no es posible conocer el tamaño de las partículas, nos permite evaluar la reproducibilidad de las preparaciones (Lanio *et al.*, 2009).

Se utilizó el turbidímetro portátil Hach modelo 21000Q, un aparato que lleva a cabo una determinación turbidimétrica en RATIO entre la señal de luz dispersa nefelométrica (90°) y la señal de luz transmitida, permitiendo realizar mediciones en el intervalo 0,00 a 1000 FNU (unidad de formacina nefolométrica).

- *Comportamiento reológico del polvo*
 - **Humedad residual**

La determinación se llevó a cabo mediante Karl-Fisher.
La humedad residual condiciona el almacenamiento y la estabilidad de los preparados farmacéuticos liofilizados. Además, una mayor concentración de humedad puede reducir la biodisponibilidad y el efecto terapéutico.
 - **Reconstitución**

Después de una inspección visual y revisión del aspecto de la torta liofilizada, se añadió agua ultrapura y se agitó manualmente. El tiempo requerido para la completa desaparición del contenido sólido se determinó por inspección visual y se registró como el tiempo de reconstitución.
 - **Ángulo de reposo**

Está relacionado con la fracción interna o cohesión de las partículas. Al dejar caer una cantidad de polvo sobre una superficie horizontal, se formará un cono. Cuanto menor sea el ángulo que forma el lateral del cono con la horizontal, menor será el desplazamiento entre las capas contiguas de partículas y por tanto mejores propiedades de flujo tendrá (Martínez Pacheco, 2016).
 - **Índice de Carr (IC)**

La compresibilidad se define como la facilidad del material para reducir su volumen cuando se somete a la acción de una fuerza externa (Martínez Pacheco, 2016).
Para calcular el índice de compresibilidad se evaluó la capacidad del polvo para reducir su volumen realizando uno de los métodos que se recoge en la Real Farmacopea Española.
Se vertió cuidadosamente en una probeta graduada una cantidad determinada de producto y se anotó el volumen aparente no asentado para posteriormente calcular la densidad aparente previa al golpeteo.

$$\rho_{\text{aparente}} = \frac{\text{masa de la muestra (g)}}{\text{volumen previo al golpeteo (mL)}}$$

$$\rho_{\text{reducida}} = \frac{\text{masa de la muestra (g)}}{\text{volumen después del golpeteo (mL)}}$$

Para obtener la densidad reducida se empleó un volumenómetro ERWEKA, que efectuó 10, 500 y 1250 golpes sobre la muestra. Tras anotar los volúmenes correspondientes se calculó la densidad reducida y consecutivamente el porcentaje de compresibilidad.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- *Eficacia de encapsulación*

La eficacia de encapsulación de citrato de sildenafilo obtenida para los liposomas frescos y con diferentes proporciones de etanol fue similar y sin diferencias estadísticamente significativas (EE = 85 %).

- *Turbidez (FNU)*

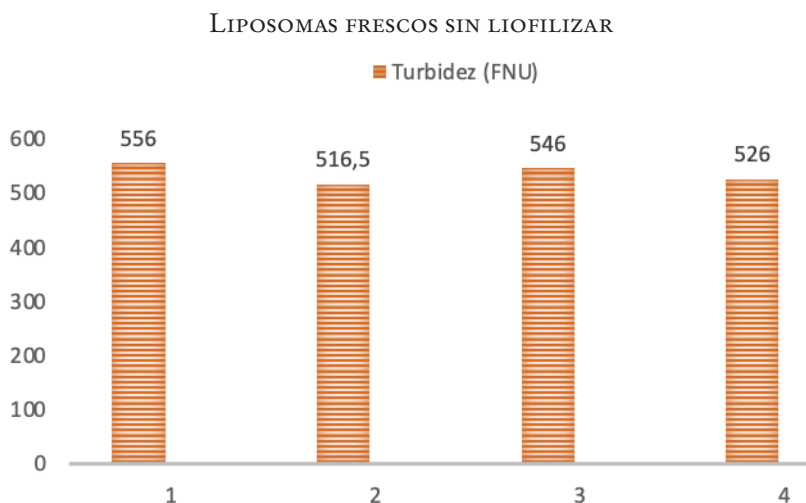


Figura 1. Resultados obtenidos de la turbidimetría en liposomas frescos.

Los lotes 1 y 3 llevaban lactosa al 4 % como lioprotector mientras que los lotes 2 y 4 contaban con una combinación de lactosa y manitol al 2 %. Las cantidades de etanol en cambio eran del 0,1 % en los lotes 1 y 2 y del 0,2 % en los lotes 3 y 4.

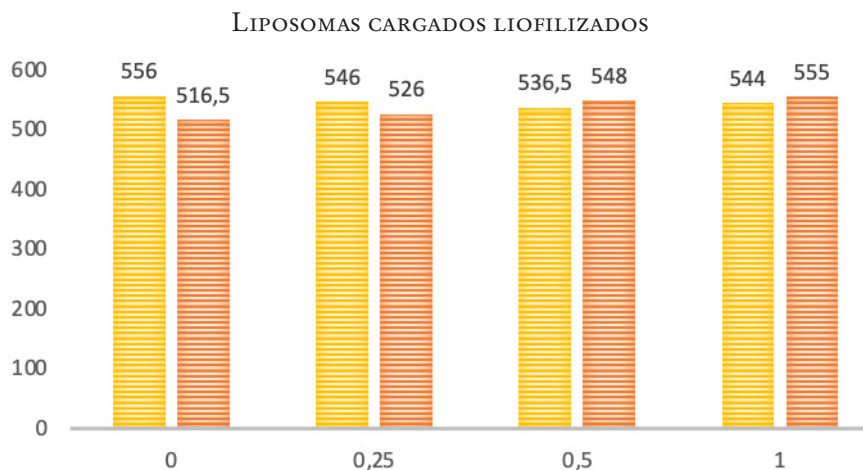


Figura 2. Resultados obtenidos de la turbidimetría en liposomas cargados.

En el gráfico de barras se encuentran representados en amarillo los lotes que contenían como lioprotector lactosa y en naranja los que llevaban incorporada la combinación de lactosa y manitol.

Los valores de turbidez obtenidos no presentan diferencias significativas entre lotes, por tanto, se puede deducir que el tamaño de partícula puede ser similar en todas las preparaciones, independientemente del lioprotector utilizado o la cantidad de etanol añadida.

	L 4 % Etanol 0,1 %	L 4 % Etanol 0,2 %	L+M 2 % Etanol 0,1 %	L+M 2 % Etanol 0,2 %
Cantidad pesada (g)	0,05049	0,04989	0,05227	0,05134
Humedad (%)	4,42428	4,49069	3,93377	3,68185
Altura (cm)	2,6	2,4	2,5	2,6
Radio (cm)	5,0	4,0	5,0	4,5
a (°)	27,474	30,964	26,565	26,985
Masa muestra (g)	7,6	7,8	7,3	7,8
V inicial (mL)	165	175	160	148
V 10 golpes (mL)	158	160	140	135

	L 4 % Etanol 0,1 %	L 4 % Etanol 0,2 %	L+M 2 % Etanol 0,1 %	L+M 2 % Etanol 0,2 %
V 500 golpes (mL)	132	135	110	118
V 1250 golpes (mL)	128	130	103	107
r aparente (g/mL)	0,046	0,044	0,045	0,053
r reducida (g/mL)	0,059	0,060	0,071	0,073
IC (%)	22,67	26,67	36,62	27,25

Figura 3. Resultados obtenidos tras la realización de los distintos ensayos.

- *Humedad residual*
 Con el proceso de liofilización se consigue eliminar un alto porcentaje de agua siendo todos los valores de humedad residual inferiores al 5 %.
- *Ángulo de reposo (a)*
 Tras analizar los valores obtenidos en el procedimiento experimental, se puede afirmar que el flujo de tres de las preparaciones es “excelente”, al permanecer los valores de ángulo de reposo dentro del intervalo 25-30°. El valor del lote 2 es más dudoso al encontrarse entre lo que podríamos considerar flujo “excelente” y “bueno”.
- *Índice de Carr (% compresibilidad)*
 Los resultados obtenidos del porcentaje de compresibilidad evidencian que la fluidez del lote que contenía lactosa al 4 % y una menor concentración de etanol es “pasable”, mientras que, en el resto de preparaciones, se considera “mediocre”.
 En este estudio existe cierta variabilidad en los resultados obtenidos y sería conveniente ampliar el número de muestras para observar la relación proporcional entre el ángulo de reposo y el porcentaje de compresibilidad del producto sólido liofilizado.

5. CONCLUSIONES

Los liposomas obtenidos son biocompatibles y biodegradables, preparados mediante el método de sonicación-filtración ya que es un proceso que no utiliza disolventes.

La liofilización de liposomas juega un papel fundamental en la conservación y la estabilidad, ya que constituye uno de los principales inconvenientes en el escalado de dichos sistemas vesiculares.

El comportamiento reológico y el diámetro aerodinámico de las partículas sólidas, administradas por vía pulmonar, influye en la distribución en el pulmón y es dependiente de su composición. La incorporación de pequeñas cantidades de etanol favorece el grado de esponjosidad del producto liofilizado, aunque no mejora las propiedades de flujo del mismo.

La incorporación de lioprotectores permite evitar transiciones de fase y fusión de membranas tanto durante el almacenamiento como en el proceso de liofilización.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Barnett CF, Machado RF. Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. *Vascular Health and Risk Management*. 2006; 2(4):411-422.
- Beltrán-Gómez M *et al.* Inhibidores de fosfodiesterasa-5 para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar. *Archivos Cardiología México*. 2015; 85(3):215-224.
- Blanco O *et al.* Viscosidad y Tamaño de Partícula de Una Preparación Clínica de Surfactante Pulmonar. *Lat. Am. J. Pharm.* 2008; 27(5):826-830.
- De Jesús Valle MJ *et al.* Lyoprotective Effects of Mannitol and Lactose Compared to Sucrose and Trehalose: Sildenafil Citrate Liposomes as a Case Study. *Pharmaceutics* 2021; 13(8):1164.
- De Jesús Valle MJ *et al.* Sildenafil Citrate Liposomes for Pulmonary Delivery by Ultrasonic Nebulization. *Applied Sciences* 2018; 8(8):1291.
- Gaspar MM *et al.* Inhaled Liposomes-Current Strategies and Future Challenges. *J Biomed Nanotechnol.* 2008; 4(3):245-257.
- Gavira Heredia FJ. Preparación de liposomas biocompatibles. Ventaja de su utilización en tratamientos contra el cáncer [Trabajo Fin de Grado]. Sevilla. Universidad de Sevilla; 2020.
- Haque S *et al.* Disposition and safety of inhaled biodegradable nanomedicines: Opportunities and challenges. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2016; 12:1703-1724.
- Lanio ME *et al.* Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Rev. Cubana. Fis.* 2009; 26(1):23-30.
- Martínez Pacheco R. Reología de sólidos pulverulentos. En: Martínez Pacheco R, editor. *Tratado de Tecnología Farmacéutica. Vol. I. Sistemas farmacéuticos.* Madrid: Síntesis; 2016. p. 93-111.
- Navarro G. Diseño de liposomas para el transporte de diclofenaco sódico *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.* 2008; 37(2):212-223.
- Rosas RMJR *et al.* Sildenafil e inhibidores de fosfodiesterasa en hipertensión pulmonar. *Neumol Cir Torax.* 2006; 65(4):186-200.
- Saharan VA. Chapter 2: Freeze drying technologies for developing fast dissolving/disintegrating tablets. En: Saharan VA, editor. *Current Advances in Drug Delivery Through Fast Dissolving/Dissintegrating Dosage Forms.* Sharjah, UAE: Bentham Science Publishers; 2017. p. 35-56.

Suñé Negre JM. Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración. Formación continuada para farmacéuticos del hospital. Disponible en: <http://www.ub.edu/legmh/capitols/sunyenegre.pdf>

Zakharova AA *et al.* Phosphodiesterase type 5 inhibitors greatly affect physicochemical properties of model lipid membranes. *Membranes (Basel)*. 2021; 11(11):893.

