

LIPOSOMAS DE ERGOSTEROL EN FORMULACIONES LIOFILIZADAS DE ADMINISTRACIÓN BUCAL

Ergosterol Liposomes in Lyophilized Formulations for Buccal Administration

Jimena BARBERO; Amparo SÁNCHEZ NAVARRO; María José DE JESÚS

Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. C. Lic. Méndez Nieto, s/n. 37007 Salamanca

*Correo-e: mariajosedj@usal.es, asn@usal.es

RESUMEN: Los liposomas son vesículas lipídicas utilizadas como vehículos de fármacos que se estabilizan mediante liofilización. La vía bucal permite conseguir efectos sistémicos o locales. El ergosterol es el principal esteroide de la membrana plasmática de los hongos y presenta diversas propiedades.

El objetivo de este trabajo es obtener formulaciones mucoadhesivas bucales a partir de liposomas de fosfatidilcolina y ergosterol preparados por sonicación y estabilizados por liofilización utilizando diferentes excipientes. Se prepararon liofilizados con dos geometrías y se caracterizaron las formulaciones obtenidas.

Se obtuvieron liposomas con un diámetro de entre 100 y 200 nm. La fosfatidilcolina se incorporó en un $97,56 \pm 24,63\%$ y la eficacia de encapsulación del ergosterol fue del $12,92 \pm 2,24\%$. Todos los liofilizados presentaron una humedad residual inferior al 3,5%. Los liofilizados con alginato se desintegraron rápidamente en contacto con el fluido salival y los de goma xantana se hincharon progresivamente. No se detectó interacción entre la mucina y el alginato pero sí con la goma xantana.

Se concluye que los liofilizados con alginato son más adecuados para formulaciones bucodispersables y los de goma xantana, para formulaciones de liberación controlada.

Palabras clave: ergosterol; liposomas; liofilización; bucal; mucoadhesivo.

ABSTRACT: Liposomes are lipidic vesicles used as drug delivery systems which can be stabilized by lyophilization. Buccal mucosa allows local and systemic drug delivery. Ergosterol is the main sterol component in the fungal membrane and has multiple properties.

The aim of the present study was to obtain mucadhesive buccal formulations based on phosphatidylcholine and ergosterol liposomes prepared by sonication and stabilized by lyophilization. Different mixtures of liposomes and excipients in blisters with two geometries were lyophilized. The resulting lyophilizates formulations were characterized.

The obtained liposomes' size was between 100 and 200 nm. $97,56 \pm 24,63\%$ of the phosphatidylcholine was incorporated to the liposomes and the entrapment efficiency for ergosterol was $12,92 \pm 2,24\%$. The residual moisture of the lyophilizates was less than 3,5%. Lyophilizates containing alginate rapidly disintegrated in contact with salivary fluid, while those with xantham gum swelled gradually. Interaction between mucin and alginate was not detected, but it was between xantham gum and mucin.

In conclusion, lyophilizates with alginate are more suitable for orodispersible formulations and those with xantham gum, for controlled release systems.

Keywords: ergosterol; liposomes; lyophilization: buccal; mucoadhesive.

INTRODUCCIÓN

Liposomas

Los liposomas son vesículas esféricas de entre 20 nanómetros y 5 micras formadas al dispersar lípidos anfílicos en agua (Liu P *et al.*, 2022).

Los liposomas se emplean como vehículos de fármacos hidrófilos o lipófilos (Franzé S *et al.*, 2018), protegiéndolos del entorno. Su composición los hace seguros y biocompatibles, y pueden comportarse como sistemas de liberación controlada y vectorización (Liu P *et al.*, 2022).

Algunos inconvenientes de los liposomas son la degradación de los lípidos o fenómenos de agregación. El método de estabilización más estudiado es la liofilización (Franzé S *et al.*, 2018).

Liofilización

La liofilización consiste en la congelación y posterior eliminación de agua por sublimación seguida de desorción en condiciones de vacío (Degobert G *et al.*, 2021). Un liofilizado mantiene sus propiedades físico-químicas iniciales, y debe poseer una humedad residual baja, reconstituirse rápidamente y ser estable a largo plazo. Los liposomas liofilizados deben mantener su estructura y distribución de tamaños sin alterar la actividad del fármaco encapsulado (Degobert G *et al.*, 2021).

Administración de fármacos a través de mucosas

Las mucosas son revestimientos de tejido húmedo formados por una capa de células epiteliales cubierta de moco y otra de tejido conectivo. El moco es un gel acuoso viscoelástico que incluye mucinas, unas glicoproteínas (Boddupalli BM *et al.*, 2010).

La administración de fármacos a través de la mucosa bucal permite conseguir efectos sistémicos o locales, es cómoda y evita el efecto de primer paso hepático (Sahatsapan N *et al.*, 2022).

Ergosterol

El ergosterol (ERG) es el principal esteroide de la membrana plasmática de los hongos; contribuye al mantenimiento de su integridad y tiene carácter anfipático (Rangsinth P *et al.*, 2023).

Por su baja solubilidad, se espera que la biodisponibilidad oral del ERG sea baja. Tras su administración oral en ratas, un 62,5% se elimina por heces y el resto se absorbe a nivel intestinal, metabolizándose a brasicasterol por la 7-dehidrocolesterol reductasa hepática (Kuwubara N *et al.*, 2022).

El ergosterol presenta numerosas propiedades farmacológicas (Rangsinth P *et al.*, 2023): es antioxidante, neuroprotector y antiinflamatorio, y tiene actividad antimicrobiana, anticancerígena y anti diabética. Expuesto a la luz ultravioleta, se transforma en ergocalciferol, un precursor de la vitamina D.

Objetivos

El objetivo de este trabajo es producir formulaciones mucoadhesivas bucales a partir de liposomas de ergosterol estabilizados por liofilización.

Se caracterizarán los liposomas, cuantificando la fosfatidilcolina y el ergosterol incorporados. Además, se evaluarán las propiedades de los liofilizados y se harán los ensayos propios de las formulaciones mucoadhesivas bucales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- **Reactivos:** acetonitrilo, ácido clorhídrico, agua ultrapura Mili-Q, alginato sódico (Alg), cloroformo, ergosterol (ERG), etanol puro, ferrotiocianato de amonio, fosfatidilcolina de yema de huevo (EPC), goma xantana (GX), lactosa, manitol, mucina de estómago porcino, tampón fosfato (PBS) pH = 7, Tween 20.
- **Equipos:** agitador magnético RSLab 1M-Mini, agitador orbital termosta-tizado Labnet 222DS, agitador rotatorio Heidolph, balanza de precisión Mettler Toledo, baño de ultrasonidos ATU serie ATM, emblistadora Nicollembal, espectrofotómetro visible GENESYS™ 20 Thermo Scientific, estufa de secado Heraeus, filtros CHROMAFIL 0,45 µm, filtros de celu-losa, HPLC Waters, micropipetas Eppendorf Reference® 2, microscopio óptico Swift 350T, liofilizador Telstar LyoBet, pH-metro serie s-619I Peak Instruments, vórtex Super Mixer Lab Line Instruments 1290.

Métodos

Preparación de liposomas por sonicación

Se pesaron la EPC y el ERG, mezclándolos en un vaso de precipitados y extendiéndolos por las paredes. A continuación, se incorporó progresivamente el medio líquido (PBS pH = 7) y se mezcló hasta formar una dispersión homogénea.

Se transfirió la dispersión a un balón de vidrio protegido de la luz que se colocó en el baño de ultrasonidos a 45 °C durante veinte minutos. Después, la mezcla se extruyó ocho veces utilizando filtros de 0,45 µm.

La mezcla extruida se almacenó en un envase topacio y se dejó una hora a temperatura ambiente. Los liposomas se conservaron en nevera al menos una hora antes de utilizarse.

La concentración de lípidos totales (% m/v) fue de 0,8, con una fracción molar de ERG (X_{ERG}) de 0,18 y de EPC (X_{EPC}), de 0,82.

Caracterización de liposomas

- **Tamaño de los liposomas:** se estimó a partir de fotografías al microscopio con un objetivo X40.
- **pH de la dispersión liposomal:** se midió utilizando un pH-metro.
- **Cuantificación de la EPC en los liposomas:** se cuantificó por triplicado colorimétricamente en espectrofotómetro según el método descrito en la bibliografía (Charles J *et al*, 1980).
- **Cuantificación del ERG en los liposomas y cálculo de la eficacia de encapsulación (EE):** se cuantificó por triplicado mediante HPLC con detección ultravioleta a $\lambda = 282$ nm. Se utilizó una columna C18 de 5 μm y una fase móvil de acetonitrilo 100% con un flujo de 1,5 mL/min.

Para la cuantificación del ERG en los liposomas, estos se rompieron agitando en vórtex 30 segundos las muestras diluidas 1:10 en etanol puro.

A partir de la cuantificación del ERG se calculó la eficacia de encapsulación (EE) según la fórmula:

$$EE (\%) = \frac{\text{Concentración de ERG medida por HPLC } (\mu\text{g/mL})}{\text{Concentración inicial de ERG } (\mu\text{g/mL})} \cdot 100$$

Liofilización de los liposomas

Se utilizaron lactosa y manitol como lioprotectores y agentes de carga, y Alg o GX como gelificantes. Se añadieron, por orden, la lactosa, el manitol y el gelificante, agitando tras la adición de cada uno y manteniendo la mezcla final en nevera hasta su liofilización.

Se liofilizaron muestras de cuatro condiciones. Todas las condiciones incluían lactosa al 3% m/v y manitol al 2% m/v, y Alg o GX al 0,5% m/v o al 1% m/v.

Para su liofilización, cada muestra se acondicionó en blísters para comprimidos redondos y oblongos, pipeteando 0,7 mL de la mezcla de liposomas y excipientes en cada uno.

Caracterización del liofilizado

- **Evaluación del aspecto.**
- **Humedad residual (HR) de los liofilizados:** se determinó gravimétricamente tras mantenerlos una hora en estufa a 120 °C por triplicado para cada condición. La HR se calculó con la fórmula:

$$HR = \frac{\text{peso inicial del liofilizado} - \text{peso del liofilizado tras una hora en estufa}}{\text{peso inicial del liofilizado}} \cdot 100$$

Caracterización de las formulaciones bucales

- **Ensayo de hinchamiento:** se midió la evolución del peso de las formulaciones por triplicado para cada condición. Cada liofilizado se pesó y se le añadió 6 mL de un fluido salival sintético preparado según bibliografía (Ali J *et al.*, 2021), manteniéndose a 35°C en un agitador orbital a 75 rpm. A los 2,5; 5; 10; 15; 30; 45; 60; 90 y 120 minutos se retiró el fluido remanente y los liofilizados se pesaron. Tras pesarlos, se volvió a añadir el fluido retirado. Esto se repitió hasta la desintegración de los liofilizados en el fluido.
- **Ensayo de mucoadhesión:** se determinó espectrofotométricamente ($\lambda = 500$ nm) la mucina libre resultante de la interacción entre la mucina y los excipientes mucoadhesivos utilizados (Alg o GX) según bibliografía (Terlizzi V *et al.*, 2022).

Se preparó fluido salival sintético con y sin mucina (FSM y FS, respectivamente) según el método descrito en la bibliografía (Ali J *et al.*, 2021).

Se prepararon mezclas de FSM con Alg o GX al 0,1%, se incubaron dos horas a 37 °C en un agitador orbital a 40 rpm para simular las condiciones de la cavidad bucal, se filtraron con un filtro de 0,45 μ m y se midió la absorbancia por triplicado para cuantificar la mucina libre.

Análisis estadístico

Se realizó mediante un test ANOVA con el programa MINITAB. Para los perfiles de evolución del peso frente al tiempo del ensayo de hinchamiento se calculó el factor de similitud (f_2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los liposomas

Tamaño de los liposomas

Se estima que los liposomas preparados tienen un tamaño de entre 100 y 200 nm (Figura 1A). Tras la liofilización mantienen sus características y su tamaño aumenta ligeramente hasta los 150 – 300 nm (Figuras 1B, 1C y 1D).

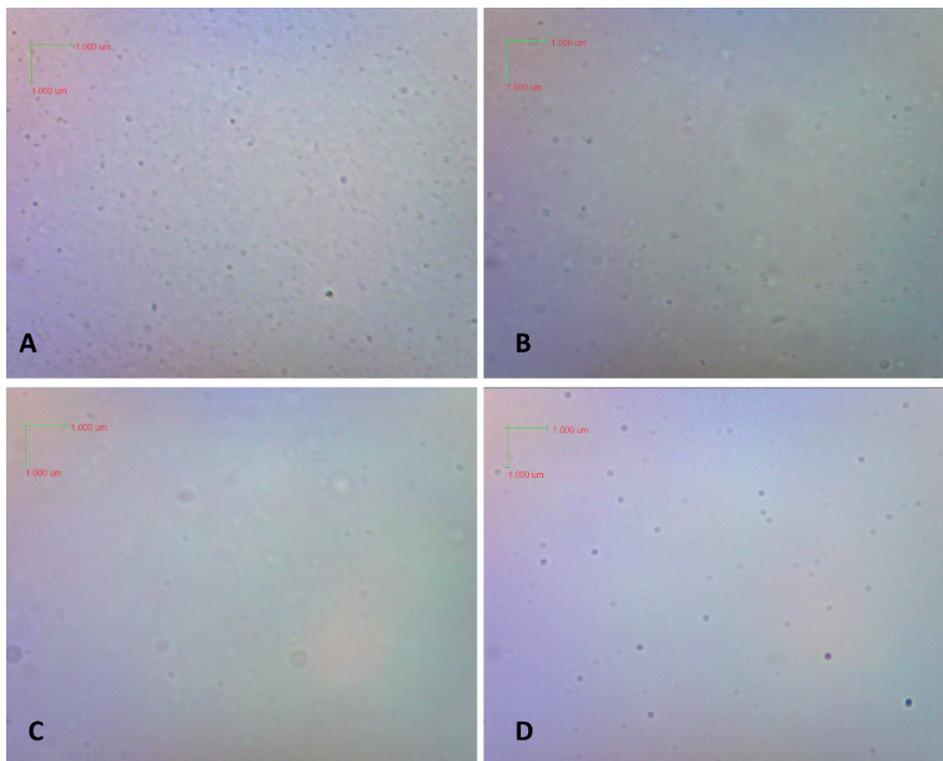


FIGURA 1: Imagen al microscopio de los liposomas (A: dispersión de liposomas; B: liposomas liofilizados reconstituidos en agua y filtrados con filtro de 0,45 µm; C: liposomas con Alg como gelificante reconstituidos en FS y filtrados con filtro de 0,45 µm; D: liposomas con GX como gelificante reconstituidos en FS y filtrados con filtro de 0,45 µm).

pH de la dispersión de liposomas

El pH de la dispersión de liposomas fue de 7,0.

Cuantificación de la EPC

A partir de la curva de calibrado realizada, se obtuvo un valor medio de EPC de $7,38 \pm 1,86$ mg/mL, con lo que se calcula que se incorpora a los liposomas el $97,56 \pm 24,63\%$ de la EPC utilizada.

Cuantificación de ERG y cálculo de la EE

Mediante HPLC se cuantificó el ERG en los liposomas y se obtuvo un valor medio de $107,87 \pm 17,60 \mu\text{g/mL}$, con lo que se calcula una EE del $12,92 \pm 2,24\%$.

Caracterización del liofilizado

Aspecto

Todos los liofilizados presentan un aspecto esponjoso y un color blanquecino uniforme, sin diferencias apreciables entre Alg y GX (Figura 2).

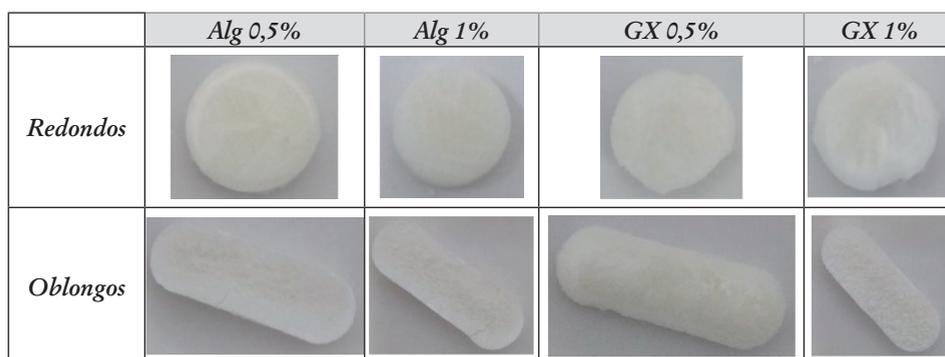


FIGURA 2: Liofilizados en blísteres redondos y oblongos.

Humedad residual

En todas las condiciones se consigue una HR inferior al 3,5% (Figura 3).

Los liofilizados oblongos presentan una HR inferior a los redondos debido a que su mayor superficie (7 cm^2 frente a 4 cm^2) facilita la eliminación de agua durante la liofilización, aunque las diferencias no resultaron significativas ($p > 0,05$).

Las diferencias de HR según tipo y concentración de gelificante son significativas ($p < 0,05$): con ambos gelificantes la HR disminuye al aumentar la concentración, y los liofilizados con Alg presentan HR mayores. No se han encontrado datos sobre la influencia de los gelificantes en la HR de los liofilizados, pero las diferencias pueden deberse a que el Alg se une al agua a través de enlaces iónicos (Abka-khajouei *et al.*, 2022), mientras que la GX establece puentes de hidrógeno (Nsengiyumva EM *et al.*, 2022).

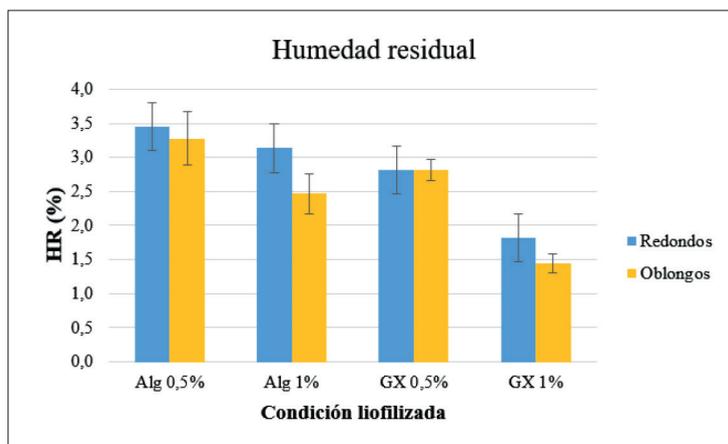


FIGURA 3: HR de las condiciones evaluadas.

Caracterización de las formulaciones bucales

Ensayo de hinchamiento

Los liofilizados con Alg, independientemente de su concentración, se desintegran en menos de 3 minutos al entrar en contacto con el FS, considerándose formulaciones bucodispersables (Real Farmacopea Española, 2015). Por el contrario, los de GX se hinchan progresivamente y tardan más en disgregarse.

Los liofilizados oblongos presentan mayores aumentos de peso que los redondos, aunque las diferencias no son significativas ($p > 0,05$), debido a que la mayor superficie de los liofilizados oblongos facilita la captación de agua por el liofilizado.

Los liofilizados con un 1% de GX presentan aumentos de peso inferiores a los liofilizados con un 0,5% de GX, aunque las diferencias no son significativas ($p > 0,05$).

La comparación del perfil de evolución del peso de los liofilizados con GX frente al tiempo a través del cálculo de f_2 indica que en todos los casos los perfiles son muy similares.

Ensayo de mucoadhesión

En las condiciones estudiadas no se detecta interacción entre la mucina y el Alg pero sí con la GX. La concentración de mucina libre tras el contacto con el Alg es de $10,65 \pm 0,14$ mg/mL y, para la GX, de $8,43 \pm 1,92$ mg/mL. Se determina

que el porcentaje de mucina unida a la GX es del $15,67 \pm 3,57$ %, mientras que para el Alg no se aprecia unión.

La GX interactúa con la mucina formando puentes de hidrógeno, uniones polares y fuerzas de Van der Waals (Ahmad M *et al.*, 2021); el Alg, a través de puentes de hidrógeno mayoritariamente (Agüero L *et al.*, 2017). A pH 7, la mucina y los dos gelificantes tienen carga negativa (Ahmad M *et al.*, 2021; Agüero L *et al.*, 2017), lo que genera fuerzas electrostáticas de repulsión capaces de contrarrestar el establecimiento de puentes de hidrógeno entre la mucina y Alg (Agüero L *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

Se han obtenido liposomas cargados con ergosterol mediante un procedimiento exento de disolventes orgánicos, optimizando un proceso de liofilización para incluirlos en formulaciones bucales.

El proceso de liofilización aplicado consigue la estabilización de los liposomas que, en el fluido salival, se rehidratan y son liberados al medio.

Los liofilizados con alginato se desmoronan rápidamente en presencia de fluido salival y no interactúan con la mucina, características más favorables para formulaciones bucodispersables.

Los liofilizados con goma xantana se hinchan progresivamente, manteniendo su integridad en presencia de fluido salival más tiempo e interactúan con la mucina, características favorables para formulaciones de liberación controlada.

No hay diferencias relevantes entre liofilizados redondos y oblongos, aunque los oblongos presentaron mejores resultados en los ensayos de hinchamiento y humedad residual. Habría que valorar su aceptación y viabilidad para su administración bucal.

BIBLIOGRAFÍA

- Abka-khajouei R, Tounsi L, Shahabi N, Patel AK, Abdelkafi S, Michaud P. Structures, Properties and Applications of Alginates. *Mar Drugs*. 2022; 20(6):364.
- Agüero L, Zaldivar-Silva D, Peña L, Dias M. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. *Carbohydr Polym*. 2017; 168:32-43.
- Ahmad M, Ritzoulis C, Chen J, Meigui H, Bushra R, Jin Y, et al. Xanthan gum – mucin complexation: Molecular interactions, thermodynamics, and rheological analysis. *Food Hydrocoll*. 2021; 114:106579.
- Ali J, Bong Lee J, Gittings S, Iachelini A, Bennett J, Cram A, et al. Development and optimisation of simulated salivary fluid for biorelevant oral cavity dissolution. *Eur J Pharm Biopharm*. 2021; 160:125-33.

- Boddupalli BM, Mohammed ZNK, Nath A. R, Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010; 1(4):381-7.
- Charles J, Stewart M. Colorimetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate. *Anal Biochem.* 1980; 104(1):10-14.
- Degobert G, Aydin D, Mosqueira F, Araújo RS. Lyophilization of Nanocapsules: Instability Sources, Formulation and Process Parameters. *Pharmaceutics.* 2021; 13(8):1112.
- Franzé S, Selmin F, Samaritani E, Minghetti P, Cilurzo F. Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging. *Pharmaceutics.* 2018; 10(3):139.
- Kuwabara N, Ohta-Shimizu M, Fuwa F, Tomitsuka E, Sato S, Nakagawa S. Ergosterol increases 7-dehydrocholesterol, a cholesterol precursor, and decreases cholesterol in human HepG2 cells. *Lipids.* 2022; 57(6):303-11.
- Liu P, Chen G, Zhang J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules.* 2022; 27(4):1372.
- Nsengiyumva EM, Alexandridis P. Xanthan gum in aqueous solutions: Fundamentals and applications. *Int J Biol Macromol.* 2022; 216:583-604.
- Rangsinth P, Sharika R, Pattarachotanant N, Duangjan C, Wongwan C, Sillapachaiyaporn C, et al. Potential Beneficial Effects and Pharmacological Properties of Ergosterol, a Common Bioactive Compound in Edible Mushrooms. *Foods.* 2023; 12(13):2529.
- Real Farmacopea Española. AEMPS; 2015.
- Sahatsapan N, Pamornpathomkul B, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Poonkhum R, Opanasopit P, et al. Feasibility of mucoadhesive chitosan maleimide-coated liposomes for improved buccal delivery of a protein drug. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2022; 69:103173.
- Terlizzi V, Scudieri P, Bertozzi F, Guerini M, Condrò G, Perugini P. Evaluation of the Mucoadhesive Properties of Chitosan-Based Microstructured Lipid Carrier (CH-MLC). *Pharmaceutics.* 2022; 14(1):170.