

Prepararea și caracterizarea unor vezicule multilamelare mari încărcate cu brimonidină tartrat

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF LARGE MULTILAMELLAR VESICLES LOADED WITH BRIMONIDINE TARTRATE

Lăcrămioara Ochiuz¹, Manuela Hortolomei¹, Iuliana Popovici¹, Marcel Popa²,
Cătălina Anișoara Peptu², Anca Niculina Cadinoiu^{2,3}

¹Disciplina de Tehnologie Farmaceutică, Facultatea de Farmacie,
Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași, România

²Departamentul de Polimeri Naturali și Sintetici, Facultatea de Chimie și Ingineria Mediului,
Universitatea Tehnică „Gh. Asachi” Iași, România

³Institutul de Cercetare „Academician Ion Hăulică”, Facultatea de Medicină Dentară,
Universitatea „Apollonia”, Iași, România

Rezumat

Brimonidina tartrat (BT) este un agonist selectiv al receptorilor α_2 adrenergici administrat topic pentru ameliorarea simptomatologiei neurovasculare din acneea rozacee.

Obiectivul acestui studiu a constat în includerea BT în lipozomi de tipul veziculelor multilamelare lipidice.

În etapa a doua a studiului veziculele multilamelare mari au fost încorporate în două tipuri de gel pe bază de carbopol și hidroxipropil celuloză în vederea preparării unor geluri lipozomale pentru aplicare topică.

Materiale și metode. BT a fost încorporată în veziculele multilamelare mari prin metoda hidratării filmului lipidic. Au fost preparate trei formulări ale acestor vezicule, notate F1, F2, F3, folosind ca fază lipidică trei sorturi de lipide cu un conținut diferit de fosfatidilcolină: 70, 80 și respectiv 96%. Veziculele au fost caracterizate sub aspectul următorilor parametri: capacitate de încărcare, dimensiune, indice de polidispersie și cedare in vitro. Ulterior cele trei formulări de vezicule multilamelare mari au fost încorporate în două baze tip gel și am evaluat eliberarea in vitro a BT din gelurile lipozomale prin metoda testului de dizolvare in vitro cu celula Franz.

Rezultatele obținute evidențiază o capacitate de încărcare cu BT a veziculelor multilamelare mari cuprinsă în intervalul 22,85-27,78%. Dimensiunea medie a veziculelor a fost de 902,66 nm iar indicele de polidispersie a avut valori cuprinse între -2,07/+0,41. Testul de cedare in vitro a BT din gelurile lipozomale a evidențiat faptul că veziculele multilamelare corespunzătoare formulelor F1 și F2 nu prezintă diferențe semnificative în profilul de eliberare a BT. Formula F3, preparată cu fază lipidică cu 96% fosfatidilcolină a prezentat o eliberare foarte lentă a BT din gelul de carbopol, de doar 19,04% timp de 12 ore.

Concluzii. Capacitatea de încărcare a BT în veziculele multilamelare mari este direct proporțională cu concentrația de fosfatidilcolină din faza lipidică. Concentrația de fosfatidil colină influențează direct și indicele de

Adresa de corespondență:

Conf. Dr. Lăcrămioara Ochiuz, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Str. Universității, nr. 16, Iași
E-mail: ochiuzd@yahoo.com

polidispersie a veziculelor. Cele trei formulări de vezicule preparate sunt compatibile cu gelurile selectate și, conform rezultatelor obținute la efectuarea studiilor preliminare de eliberare *in vitro*, acestea ar putea fi folosite ca sisteme de administrare topică a BT.

Cuvinte cheie: brimonidină, vezicule multilamelare mari, gel lipozomal

Abstract

Brimonidine tartrate (BT) is a selective α_2 -adrenergic agonist topically administered for the relief of the neurovascular symptoms of rosacea. The objective of the present study was to develop liposomal systems as BT-loaded multilamellar vesicles. The subsequent aim was to develop some liposomal gels for topical administration by dispersing the liposomal vesicles in two different gels based on Carbopol 940 2% and Hydroxypropyl-cellulose 3.5%.

Materials and methods. BT was entrapped within the multilamellar vesicles by the thin film hydration method. Three formulas of multilamellar vesicle liposomes were prepared, designed as F1, F2, and F3. The formulas were prepared using three lipids with different content in phosphatidylcholine: 70, 80 and 96%, respectively. The vesicles were characterized in terms of the following parameters: size, entrapment efficiency, zeta potential and *in vitro* drug release. Subsequently, the three of the large multilamellar vesicle formulations were dispersed in two gel bases. The *in vitro* release profile of BT from liposomal gels was assessed by the *in vitro* dissolution test with Franz diffusion cell.

The **results** emphasized that the entrapment efficiency of BT has values included in the range 22.85-27.78%. The mean size of vesicles was 902.66 nm and polydispersity index ranges between - 2.07 and + 0.41. *In vitro* dissolution test revealed that formulas F1 and F2 do not show significant differences in the release profile of BT. The F3 formula, prepared with 96% phosphatidylcholine in lipid phase, exhibited a very slow release of BT from Carbopol gel, only 19.04 during 12 hours.

Conclusions. The entrapment efficacy of multilamellar vesicles with BT is directly proportional to the concentration of phosphatidylcholine in the lipid phase. This parameter of the formulation has a direct influence on the vesicle polydispersity index of multilamellar vesicle, as well. The three vesicle formulations studied were compatible with the selected gels. Preliminary results of the *in vitro* BT release investigation are promising about developing topical delivery systems for BT.

Keywords: brimonidine, multilamellar vesicles, liposomal gel

INTRODUCERE

Acneea rozacee este o afecțiune cutanată care se manifestă prin eritem facial tranzitoriu sau persistent, telangiectazie, papule și pustule. Eritemul facial persistent este cel mai mult asociat cu subtipurile I și II de acne rozacee, numite eritematotelangiectatic și respectiv subtipul papulopustular. Acneea rozacee, în special eritemul facial, este declanșată de un număr mare de factori, dintre care menționăm: expunerea la soare, stresul, temperatura, consumul de alcool etc. Eritemul facial este reconșcut ca fiind cea mai relevantă manifestare clinică a acestei forme de acnee și, de asemenea, cea mai dificilă de tratat (1,2). Fiziopatologia eritemului facial este relativ necunoscută. Se presupune că eritemul facial apare ca rezultat al unor dezechilibre ale răspunsurilor vasomotorii cutanate care determină dilatarea anormală și persistentă a vaselor sanguine faciale. Severitatea acneei rozacee este asociată și cu dilatarea

prelungită a vaselor mici de sânge ($\leq 200 \mu\text{m}$). Această constatare sugerează că vasodilatația poate apărea ca rezultat al eliberării unor mediatorii ai reacțiilor inflamatorii în primele faze ale acneei rozacee (3,4). Una dintre cele mai recente abordări orientate spre reducerea eritemului constă în aplicarea topică a unor blocanți ai receptorilor adrenergici.

Brimonidina (BT) este un agonist selectiv al receptorilor α_2 - adrenergici cu o activitate vasoconstrictoare puternică. Recent această substanță activă a fost aprobată pentru tratamentul local al eritemului facial persistent din acneea rozacee, manifestată la pacienții cu vârste peste 18 ani (5).

Deși BT a fost aprobată pentru utilizare terapeutică în tratarea acneei rozacee, doar de câteva luni au fost raportate reacții adverse pe zonele de aplicare a preparatului, cum ar: accentuarea eritemului, înroșirea feței, arsură locală (6). Obiectivului acestui studiu a

constat în includerea BT în lipozomi de tipul veziculelor multilamelare lipidice.

În etapa a doua a cercetării veziculele multilamelare mari au fost încorporate în două tipuri de gel pe bază de carbopol și hidroxipropil celuloză în vederea preparării unor geluri lipozomale pentru aplicare topică.

MATERIALE ȘI METODE

Materiale

Brimonidină tartrat (LGM Pharma, SUA); *Lipoid E 80*, *Lipoid E 80S*, *Lipoid E PC S* (Lipoid GmbH, Germania); *Colesterol* și *Triton X-100* (Sigma Aldrich, Germania); *Cloroform* (Farmachim, Romania), *Hidroxipropil celuloza* (Nisso Chemical Europ, Dusseldorf), *Carbopol 940* (Lubrizol Advanced Materials, SUA).

Metode

Prepararea veziculelor lipidice multilamelare

Veziculele lipidice multilamelare au fost preparate prin metoda hidratării filmului lipidic descrisă de Tseng LP et al. (7). Faza lipidică a fost dizolvată într-un volum corespunzător de cloroform (Tabelul 1).

TABELUL 1. Faza lipidică a formulelor lipidice multilamelare

Substanță lipidică	Concentrație fosfatidilcolină (% m/m)	Abrevierea formulei
<i>Lipoid E 80</i>	80	F ₁
<i>Lipoid E 80 S</i>	70	F ₂
<i>Lipoid E PC S</i>	96	F ₃

Solventul organic a fost evaporat cu ajutorul unui rotavapor Heidolph la 100 rpm, 40 °C și presiune redusă, de 400 mbarr. Filmul lipidic astfel obținut a fost hidratat cu o soluție 6% (m/v) BT la 40 °C. Amestecul a fost agitat energic pentru formarea veziculelor multilamelare și ulterior a fost supus unui proces de ultrasonare în vederea dispersării agregatelor existente. Separarea veziculelor lipidice de BT neîncapsulată a fost realizată prin spălare și centrifugare la 12.000 rpm/40 min.

Caracterizarea veziculelor lipidice multilamelare

Evaluarea gradului de încărcare cu BT a veziculelor lipidice a realizată prin introducerea unui volum determinat de suspensie de vezicule în soluție Triton X 2%. BT eliberată în soluție a fost determinată cantitativ printr-o metodă spectrofotometrică validată utilizând dispozitivul NanoDrop 8000 – spectrofotometru UV-VIS (BT λ = 320 nm). Gradul de încărcare a veziculelor lipidice a fost exprimat procentual, conform următoarei ecuații:

$$E(\%) = \frac{M_{BTp}}{M_{BTt}} \cdot 100$$

E – eficacitatea metodei de încapsulare;

M_{BTp} – cantitatea de BT determinată experimental în veziculele lipidice

M_{BTt} – cantitatea teoretică de BT.

Determinarea dimensiunii și a indicelui de polidispersie a veziculelor lipidice multilamelare a fost realizată pe un volum de 2 ml suspensie de vezicule cu ajutorul dispozitivului Malvern Zetasizer Nano ZS.

Prepararea gelurilor lipozomale cu BT

Gelurile lipozomale au fost preparate prin dispersarea unui volum determinat de vezicule lipidice în 2 tipuri de gel: gel de hidroxipropil celuloză 3,5% și gel de carbopol 940 2%. Volumul de vezicule dispersat în bază a fost calculat în funcție de gradul de încărcare al veziculelor, astfel încât să preparăm geluri lipozomale cu o concentrație de 0,5% BT.

Testul de dizolvare in vitro a BT din gelurile lipozomale

Cedarea BT atât din veziculele lipidice, cât și din gelurile lipozomale a fost realizată prin testul de dizolvare *in vitro* cu celula Franz, în următoarele condiții de lucru: sistem tampon pH = 7,4 mediu de dizolvare în compartimentul acceptor al celulei Franz; T= 37 °C ± 0,2 °C; 50 rpm; la intervale determinate de timp, pe un interval de 12 ore, a fost recoltat un volum de 0,2 ml mediu din compartimentul acceptor (acest volum a fost înlocuit cu mediu proaspăt). În mediul prelevat la fiecare moment al testului BT a fost determinată cantitativ prin metoda spectrofotometrică descrisă anterior.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În Tabelul 2 sunt prezentate rezultatele obținute la caracterizare veziculelor lipidice sub aspectul gradului de încărcare medicamentoasă, al dimensiunii și al indicelui de polidispersie.

TABELUL 2. Vezicule lipidice multilamelare încărcate cu BT – caracteristici farmacotehnice

Vezicule lipidice – abreviere formule	Eficacitatea încapsulării (%)	Dimensiune (nm)	Indice de polidispersie
F ₁	22,85 (± 1,87)	897	- 2,07
F ₂	24,11 (± 1,13)	901	-1,34
F ₃	27,78 (± 0,96)	910	0,41

Rezultatele obținute evidențiază faptul că fosfatidilcolina are o influență majoră asupra gradului de dispersie a veziculelor lipidice. Astfel, prin creșterea

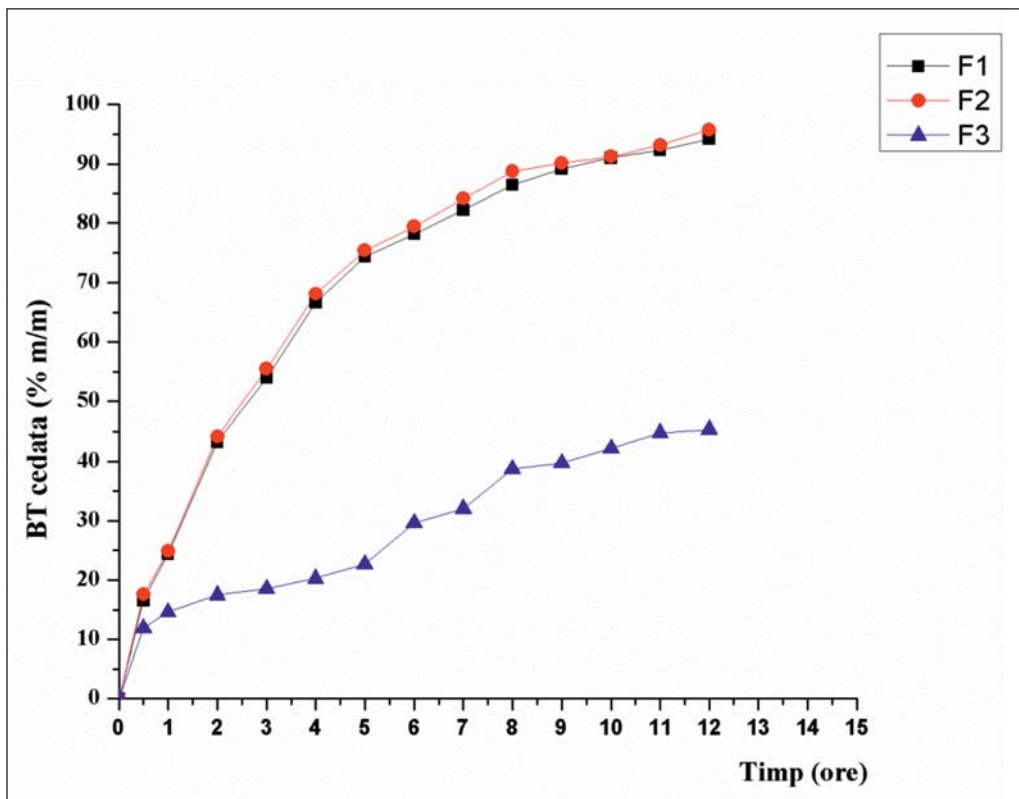


FIGURA 1. Profilul de eliberare a BT din veziculele lipidice multilamelare

concentrației de fosfatidilcolină în faza lipidică se formează vezicule lipidice uniforme ca dimensiune, ceea ce se reflectă în valoarea indicelui de poli-dispersie. Veziculele lipidice multilamelare studiate au prezentat un grad de încărcare cu BT de aproximativ

25%, și sub acest aspect s-a observat faptul că formula F₃ a prezentat cel mai mare grad de încapsulare a BT.

Profilul de eliberare a BT din veziculele lipidice este, de asemenea, influențat de concentrația de

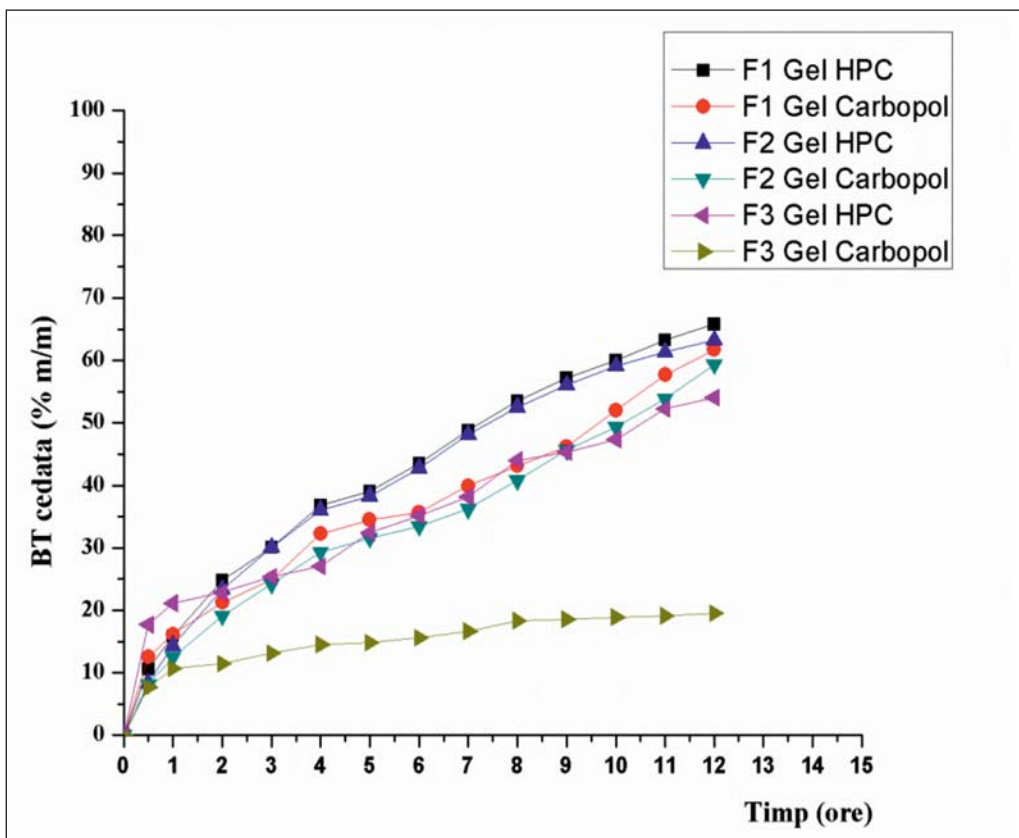


FIGURA 2. Profilul de eliberare a BT din gelurile lipozomale

fosfatidilcolină din formulă. În cazul formulele F_1 și F_2 nu se observă diferențe majore însă formula F_3 a asigurat o cedare de doare 45% pe un interval de 12 ore (Fig. 1). Aceste rezultate conduc spre concluzia conform căreia creșterea concentrației de fosfatidilcolină în formula veziculelor lipidice determină o diminuare a ritmului de eliberare a BT.

Ritmul de eliberare a BT din gelurile lipozomale este identic cu cel observat la eliberarea BT din suspensia de vezicule lipidice. Menționăm faptul ca formula F_3 a generat cel mai lent ritm de eliberare a BT, atât din gelul pe bază de hidroxipropil celuloză, cât și din gelul pe bază de Carbopo I (Fig. 2). De asemenea, precizăm faptul că formulele veziculelor lipidice studiate sunt compatibile cu gelurile selectate, nefiind observată nici o modificare macroscopică în momentul dispersării veziculelor lipidice în geluri. Sunt în curs de desfășurare studii pentru a determina posibile interacțiuni între

macromoleculele formatoare de gel și lipidele din structura membranelor veziculelor lipidice.

CONCLUZII

Au fost preparate trei formule de vezicule lipidice multilamelare cu BT folosind trei lipide cu un conținut diferit de fosfatidilcolină. Capacitatea de încărcare a BT, dimensiunea și indicele de polidispersie a veziculelor lipidice multilamelare este direct proporțională cu concentrația de fosfatidilcolină din faza lipidică. Cele trei formulări de vezicule preparate sunt compatibile cu gelurile pe bază de hidroxipropil celuloză și Carbopol. Eliberarea BT din gelurile pe bază de Carbopol se realizează cu o viteză mai lentă comparativ cu ritmul de eliberare a BT din gelurile pe bază de hidroxipropil celuloza. Rezultate obținute în cadrul acestor studii confirmă ipoteza încorporării BT în vezicule lipidice multilamelare ca sisteme de administrare topică.

BIBLIOGRAFIE

1. **Maier L.E.** Rosacea: advances in understanding pathogenesis and treatment. *Clin Invest.* 2011; 1:739-755.
2. **Goldgar C., Keahey D.J., Houchins J.** Treatment options for acne rosacea. *Am Fam Physician.* 2009; 80:461-468.
3. **Bladwin H.** Oral therapy for rosacea. *J Drugs Dermatol.* 2006; 5:16-21.
4. **Nally J., Berson D.** Topical therapies for rosacea. *J Drugs Dermatol.* 2006; 5:23-27.
5. **Moore A., Kemper S., Murakawa G.** et al. Long-term safety and efficacy of once-daily topical brimonidine tartrate gel 0.5% for the treatment of moderate to severe facial erythema of rosacea: results of a 1-year open-label study. *J Drugs Dermatol* 2014; 13 (1): 56-61.
6. *** Case letter *J Am Acad Dermatol*, February 2014 e37.
7. **Tseng L.P., Liang H.J., Chung T.W., Huang Y.Y., Liu D.Z.** Liposomes Incorporated with Cholesterol for Drug Release Triggered by Magnetic Field, *J Med and Biolog Engin*, 27(1):29-34, 2007