

Caracterização de formulação lipossomal contendo clonidina

(Characterization of clonidine in liposomal formulation)

R. S. Nunes¹; J. R. Azevedo¹; N. L. Pereira²

¹Laboratório de Farmacotécnica, Universidade Federal de Sergipe, 49100-00, São Cristóvão-SE, Brasil

²Programa de Pós-graduação em fármacos e medicamentos da Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 14.040.903- Ribeirão Preto, SP, Brasil

rogeriabr@hotmail.com

(Recebido em 05 de outubro de 2005; aceito em 19 de outubro de 2005)

O desenvolvimento de sistemas de liberação tem sido alvo de pesquisas há várias décadas. Desde que foi sugerida sua aplicação, muitos resultados foram obtidos especialmente no desenvolvimento de sistemas carreadores e no estudo de suas interações com os fármacos encapsulados. Entre os principais carreadores, destacam-se os lipossomas, que apresentam a capacidade de veicular fármacos proporcionando a encapsulação de substâncias de várias natureza, em razão de sua estrutura. Neste estudo foram caracterizados a estabilidade do encapsulamento e a liberação da clonidina em uma formulação lipossomal. Como esperado, a resposta ao conteúdo de clonidina encapsulada (40%) foi de acordo com o método utilizado. O perfil de liberação da clonidina a partir da formulação foi de 20,14% em 8h. Este valor foi comparado à quantidade liberada da clonidina em solução que foi de 37,8% em 8h. Propondo uma formulação que estabelece uma estabilidade na taxa de encapsulação e a modificação da liberação do fármaco.

Palavras-chave: formulações lipossomais, clonidina, liberação de fármacos.

Many researchers in the last four decades have been devoted to the development of drug-delivery systems. Since its first application many results have been obtained especially in manipulation of carriers and their interaction with encapsulated drugs. Liposomes are among the most important carriers. Liposomes have the ability to encapsulation of drugs of variety nature. In this study, we characterized the encapsulation and delivery of clonidine in liposomal systems. The stable entrapped efficacy of clonidine was of 40%. The release profile of clonidine in formulation werw quantified. The formulation release 20,40% in 8h. These value was compared to the clonidine release in solution, which was of 37,8% in 8h. Proposed formulations provided stable percentage of entrapped drug and drug modification release.

Keywords: liposomal formulation, clonidine, drug release.

1. INTRODUÇÃO

Existe a preocupação em compreender o fenômeno da dor e, conseqüentemente, conceituá-lo. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, esse fenômeno é caracterizado por uma experiência sensitiva e emocional desagradável, em que há percepção de um estímulo nocivo associado à lesão tecidual real ou potencial. De acordo com a duração da lesão tecidual pode-se classificar a dor em aguda ou de curta duração, que persiste apenas enquanto durar o dano representando uma reação fisiológica normal; e as dores crônicas ou lentas, associadas às lesões mais profundas, evidenciando-se quando cessa a função dos mecanismos normais de cicatrização e estados patológicos que podem persistir por um longo período, como câncer, artrite reumatóide e pinçamentos nervosos [1].

Por isso, a capacidade de instituir novos métodos de tratamento com o objetivo de produzir analgesia, isto é, aliviar ou eliminar a dor, é um desafio atual.

Nas últimas décadas, alguns anestésicos locais como lidocaína, bupivacaína e, mais recentemente, levobupivacaína e ropivacaína, têm sido introduzidos na terapia da dor aguda e crônica na tentativa de melhorar a ação dos fármacos já utilizados [2].

A clonidina, agonista dos receptores α_2 -adrenérgico, tem sido bastante utilizada como fármaco adjuvante, em anestésias gerais, uma vez que produz sedação e reduz a ansiedade sem associação à depressão respiratória. Seu uso também tem ganhado destaque como medicação analgésica em procedimentos pós-operatório para controle de processos dolorosos [3, 4, 5]. No

entanto, a duração de sua ação é relativamente curta, quando comparada com a potencial duração da dor. Sugerindo varias aplicações para manutenção dos níveis plasmáticos. Prolongar o efeito de fármacos através de carreadores tem sido extensivamente descrito pela literatura [6]. E no caso de fármacos com ação anestésica e analgésica carreadores de fármacos têm sido bastante sugeridos, devido sua biodegradabilidade, atoxicidade de seus componentes, e a capacidade de encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos em um variado percentual [7].

O objetivo deste trabalho foi obter formulações lipossomais e caracterizá-las em relação ao percentual de encapsulação e perfil de liberação *in vitro* em membrana hidrofílica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materials

Fosfatidilcolina de soja (Phospholipon ® 90G – Natterman Phospholipon GmbH, Colonne, Germany), colesterol (Sigma – USA), clonidina solução injetável Cristália ® 150µg/mL, membrana de diálise – acetato de celulose 33mm – Interlab e membrana de policarbonato – Nucleopore Costar 20mm com poro de 0,22µm. Os demais reagentes foram todos grau analítico – Merck.

Preparação da formulação

A formulação lipossomal contendo clonidina, 150µg/mL, foi preparada pela técnica de hidratação do filme lipídico com formação espontânea de lipossomas do tipo MLV. A fase lipídica (Phospholipon 90G -196mg e colesterol – 40mg) foi dissolvida em clorofórmio, esse foi evaporado em rota evaporador para formação do filme lipídico. Traços do solvente foram retirados em dessecador a vácuo após um período de permanência de 24 horas [8]. O filme lipídico foi hidratado com a solução de clonidina obtendo a relação de 150µg do fármaco por mL de formulação. A formulação foi submetida à extrusão em membrana de policarbonato 0,22µm, manualmente utilizando uma seringa com três ciclos de extrusões consecutivos [9, 10].

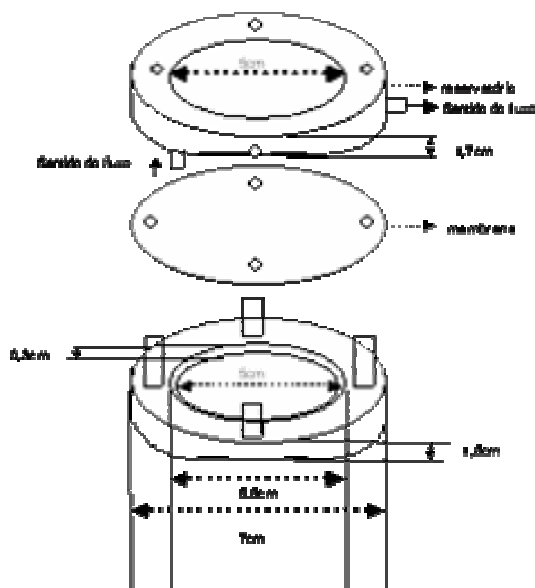


Figura 1: Diagrama esquemático do modelo da célula de difusão com suas respectivas medidas.

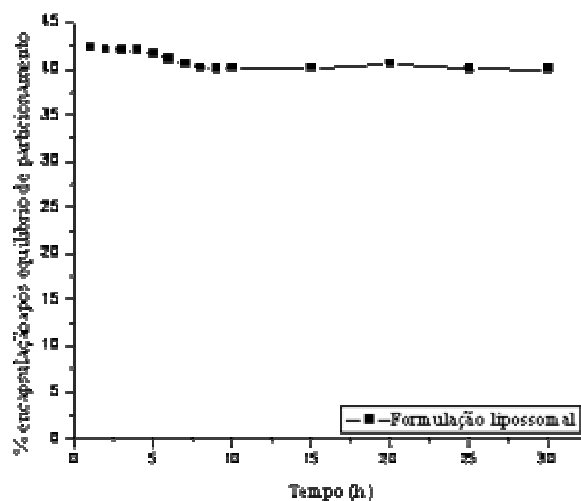


Figura 2: Perfil de encapsulação da clonidina em lipossomas após equilíbrio de particionamento.

Caracterização da formulação

O percentual de encapsulação foi determinado por ultracentrifugação (Beckman 28 – 55) da amostra a 40.000 rpm obtendo uma fase precipitada e uma fase sobrenadante. A clonidina não encapsulada foi avaliada na amostra do sobrenadante em espectrofotômetro UV/VIS Fento – 800XI no comprimento de onda de 224nm a partir da equação 1 [11]:

$$P = \frac{(Q_1 - Q_2) \times 100}{Q_1} \quad (1)$$

P representa o percentual de encapsulação, Q_1 representa a quantidade total de clonidina e Q_2 representa a quantidade de clonidina no sobrenadante.

Os valores das concentrações foram obtidos a partir de medidas indiretas dos valores de absorvância, avaliados a partir da curva analítica da clonidina. Esta foi obtida a partir da diluição da solução mãe da clonidina em tampão fosfato pH 7,4 para concentrações conhecidas. A linearidade foi obtida na faixa de concentração de 10 - 80 μ g/mL ($r = 0,9987$).

A eficiência de encapsulação foi avaliada em um período de trinta horas para observar o perfil de equilíbrio de particionamento entre a clonidina e os lipossomas formados.

Experimento de liberação

A cinética de liberação da clonidina, foi determinada a partir do experimento de liberação, em triplicata, utilizando membrana de acetato de celulose como modelo sintético de membrana hidrofílica (12). O perfil de liberação da clonidina foi avaliado em solução (150 μ g/mL) e a partir da formulação lipossomal (150 μ g/mL) com amostras de 2mL respectivamente. Para a realização do ensaio foi utilizada célula de difusão em acrílico (figura 1) com área de difusão de 19,625cm² e capacidade para até 4g de formulação. A solução receptora (60mL) foi o tampão fosfato pH 7,4 mantido em agitação magnética a 150 rpm, termostatizada a 37°C e circulando em um fluxo de 10mL/min. por intermédio de uma bomba peristáltica, mantendo as condições Sink para o experimento. As amostras foram coletadas em período de tempo determinados: de 15 minutos a 480 minutos. Foram coletados 3mL da fase receptora a cada tempo, com o mesmo volume sendo repostado em tampão fosfato pH 7,4.

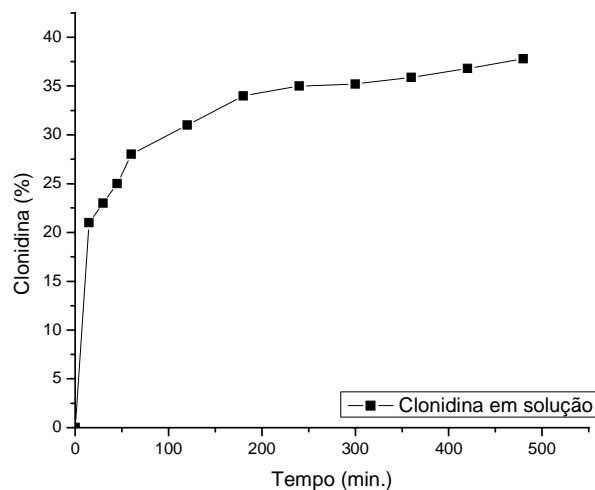


Figura 3: Perfil de liberação da solução de clonidina.

3. ANÁLISE DOS RESULTADOS

A determinação das quantidades acumuladas liberadas no tempo foi realizada a partir da equação 2 [13]:

$$Q_{real,t} = Q_{medida,t} + \sum_{i=1}^{n-1} V_a \cdot C_a \quad (2)$$

Q representa quantidade liberada acumulada, $Q_{real,t}$ representa o valor real medido no tempo, V_a representa o volume da amostra removido e C_a representa a concentração da amostra removida.

Os perfis de liberação da clonidina, após o uso de uma dose de 300 μ g, foram avaliados a partir do plot das quantidades liberadas acumuladas versus o tempo. A significância dos resultados foi avaliada pelo teste-T.

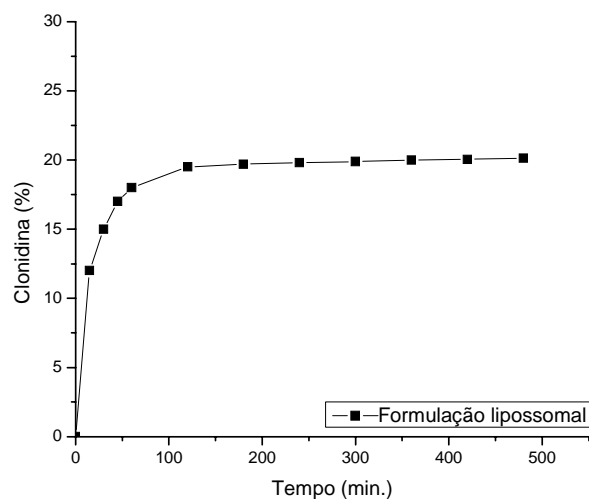


Figura 4: Perfil de liberação da clonidina na formulação lipossomal.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As formulações contendo lipossomas são bastante utilizadas como sistemas que modificam a liberação de fármacos, uma vez que os lipossomas atuam como microreservatórios, que modulam a saída do fármaco que se encontra em seu conteúdo interno. Um dos parâmetros utilizados para caracterizar estes microreservatórios, dentre outros, é a eficiência de encapsulação [14, 15, 16, 17]. Neste trabalho, foi descrita a habilidade de carreamento da clonidina a partir de uma formulação lipossomal, obtida pela técnica de hidratação do filme lipídico com formação espontânea de lipossomas MLV. A eficiência de encapsulação da clonidina nos lipossomas formados foi de 40% conforme está representado na figura 2, considerando o equilíbrio de particionamento entre a clonidina e os lipossomas formados. Durante o período de 60 dias a formulação foi avaliada apresentando estabilidade no perfil de encapsulação da clonidina.

A formulação obtida apresentou modificação no perfil de liberação da clonidina, quando comparada à solução de clonidina, avaliada *in vitro* através de membrana sintética de acetato de celulose (figura 3 e 4), descrevendo um perfil de liberação modificada. A quantidade de clonidina liberada em 8 horas a partir da formulação lipossomal foi de 20,14% comparada à quantidade cumulativa de clonidina liberada em 8 horas a partir da solução de clonidina que foi de 37,8%. A difusão da clonidina em solução através da membrana de acetato de celulose ocorreu em um maior percentual quando comparada à formulação lipossomal uma vez que não houve interferência de possíveis interações com o veículo, o que ocorre com a clonidina presente na formulação avaliada. Essa interação fármaco-componente lipídico da formulação, justifica o perfil de liberação encontrado. A natureza hidrofílica da membrana utilizada não interferiu no processo de liberação considerando o particionamento do fármaco entre a formulação e a membrana, o que justificou a saturação observada no perfil de liberação.

5. CONCLUSÃO

A formulação lipossomal apresentou um perfil de liberação modificada para a clonidina quando comparada com a clonidina em solução caracterizando um sistema do tipo reservatório. A utilização de uma membrana semipermeável hidrofílica foi significativa no sentido de não promover interferências na liberação da clonidina sugerindo que o passo limitante do processo de liberação é a partição da clonidina com a estrutura lipídica da formulação. A formulação apresentou uma boa estabilidade e neste sentido apresenta-se como uma alternativa promissora como modelo de sistema de liberação para a clonidina.

-
1. Araújo, D. R. P.; Pinto, L. M. A.; Braga, A. F.A.; Eneida, P. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 53:5: 663-671 (2003).
 2. Whiteside, J.B.; Wildsmith, J. W-Developments in local anesthetics drugs. *Brasilian Journal of Anaesth.*, 87, 27-35 (2001).
 3. Bernard, J.M.; Lagard, D.; Souron, R. Balanced postoperative analgesia-effect of intravenous clonidine on blood-gases and pharmacokinetics of intravenous fentanyl. *Anesthesia and analgesia*, 79, 1126-1132 (1994).
 4. Kimura, K.; Ishihara, K.; Tagawa, T.; Sakurai, M.; Fujii, J.; Dotes, S.; Nause, T.; Sasa, M.; Namba, K. Effect of a newly development transdermal clonidine delivery systems (M-5011T) on EEG sleep-wake cycle in relation to plasma concentration in rabbits. *General Pharmacology*, 27: 73-77 (1996).
 5. Barione, M.F.; Lauretti, G.R.; Lauretti, F.O.A.; Pereira, N.L. Clonidine as adjuvant in eye surgery: comparison of peribulbar versus oral administration. *Journal of Clinical Anesthesia*, 14, 140-145 (2002).
 6. Barry, B.; Williams, A.C.; El Maghraby, M.M.G. Skin delivery of oestradiol from lipid vesicles: importance of liposome structure. *International Journal of Pharmaceutical*, 204, 159-169 (2000).

7. How, W-J.; Sun, P.; Yo, H-Y. Prolonged local anesthetic effect of bupivacaine liposomes in rats. *International Journal of Pharmaceutical*, 176, 133-136 (1998).
8. Amselen, S.; Gabizon, A.; Barenholz, Y. Optimization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for clinical use. *International Journal of Pharmaceutical*, 79, 1045-1052 (1990).
9. Crommelin, D.J.A.; Junginger, H.E.; Joesten, J.G.H.; Spies, F.; Talsma, H.; Jousma, H. Characterization of liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers. *International Journal of Pharmaceutica*, 35, 263-274 (1987).
10. Brandl, M.; Schubert, R.; Bender, J.; Sachse, A.; Berger, N. Filter extrusion of liposomes using different devices. Comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutical*, 223, 55-68.(2001).
11. Wells, J.I. *Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical properties of drug substances*. First ed. England: Ellis Howoord limited, 1988.
12. Urtli, A.; Tapale, H.; Jarvinen, T.; Saarinen-Savolainen, P.,. Method for evaluating drug release from liposomes in sink conditions. *International Journal of Pharmaceutical*, 159, 27-33 (1997).
13. Liao, H-M., Yu, H-Y, Triancinolone permeation from different liposome e formulations through rat skin in vitro. *International Journal of Pharmaceutical*, 127, 1-7 (1996).
14. Rogers, J.A.; Choi, Y.W. Characterization of distribution behavior of 2-imidazolines into multilamellar liposomes. *Journal Pharmaceutical Science*, 80: 757-760 (1991).
15. Hesterberg, D.; Hutchison, K.; Grant, C.S.; Sáez, A.E.; Colberg, M.T. Dynamic hydration of phospholipid films in aqueous environments. *Colloids and Surfaces*, 151, 483-495 (1999).
16. Romero, E.L.;Bakas, L.; Lopes, M.O.; Benavidez, P.'Morilla, M.J. Development and in vitro characterization of a benzimidazole liposomal formulation. *International Journal of Pharmaceutical*, 249, 89-99 (2002).
17. Muller-Goymann, C.C.; Mackeben, S.; Muller, M. Physicochemical characterization of liposomes with encapsulated local anaesthetics. *International Journal of Pharmaceutical*, 274, 139-148 (2004).