

# Liposomas de acetónido de triamcinolona: Influencia de la composición en el rendimiento y estabilidad

*Liposomal Triamcinolone acetonide: Influence of composition  
in performance and stability*

CLARES B, MEDINA MM

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.  
Campus de Cartuja s/n 18071 Granada.  
Correo electrónico: mdelmar@ugr.es

## RESUMEN

El acetónido de triamcinolona, antiinflamatorio esteroideo, presenta por vía tópica los inconvenientes de la corticoterapia. No obstante, su incorporación a un sistema transportador, como los liposomas permitiría prolongar la dosis efectiva en el lugar de acción (dermis y epidermis), reduciendo los efectos secundarios. Así pues, se ha normalizado el método de elaboración de liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona y evaluado el grado de captación del fármaco seleccionado, en función de la composición de los liposomas, determinando los componentes más idóneos para su obtención y los rendimientos proporcionados al variar las concentraciones de los mismos. La adición de colesterol para mejorar su estabilidad, provoca una reducción media en la captación; no obstante la encapsulación sigue siendo bastante elevada. La evaluación de la estabilidad muestra la influencia de la temperatura de conservación, de tal manera que los liposomas mantenidos a temperatura de refrigeración (4-6°C) poseen una estabilidad mayor que las muestras a temperatura ambiente.

PALABRAS CLAVE: Liposomas. Triamcinolona Acetónido. Biofase. Vector.

## ABSTRACT

*In topical presentation, Triamcinolone acetonide, a steroidal anti-inflammatory preparation, presents all the disadvantages of corticotherapy. However, on incorporation into a liposomal drug delivery system, the effectiveness of each dosage within the area of its activity (dermis and epidermis) is prolonged, serving to reduce secondary side effects. For this reason, an attempt has been made to standardize a method for the preparation of a multilaminar liposomal delivery system of triamcinolone acetonide and to assess how much of the drug could be encapsulated by the varying liposomal formulations tested and consequently, which of these would prove to be the most suitable. The addition of cholesterol to such formulations was found to improve stability. However, although such an addition was found to reduce levels of encapsulation of the drug, these still remained sufficiently high. In the assessment of stability, storage temperature was found to bear an influence. Liposomes kept under cold storage (4-6°C) presented higher stability than samples stored at room temperature.*

KEY WORDS: Liposomes. Triamcinolone Acetonide. Biophase. Vector.

Fecha recepción: 26-09-06

Fecha aceptación: 18-04-07

## INTRODUCCIÓN

En el tratamiento de un proceso fisiopatológico, es deseable que la administración de medicamentos se realice de tal forma que el fármaco alcance su lugar de actuación (biofase) a una determinada concentración, dentro de un rango de dosis terapéuticas efectivas, permaneciendo la misma constante durante el tiempo necesario para alterar el mencionado proceso. Dicha administración aparece limitada por resistencias al fármaco, captura del medicamento por otras células del organismo, incapacidad del fármaco para penetrar en las células o tejidos en tratamiento o por carecer de un tropismo específico, distribuyéndose por el organismo y dirigiéndose no solo a la biofase, sino también al resto de células y tejidos. En consecuencia, para obtener una concentración suficiente a nivel de las células blanco, es necesario administrar dosis relativamente elevadas, que conducen a efectos toxicológicos e inmunológicos indeseables<sup>1</sup>.

Desde el punto de vista galénico, la solución a estos problemas podría estar en la asociación química de la sustancia activa a un transportador apropiado, dotado de un poder de reconocimiento para un determinado tipo de células (citotropismo) y capaz de conferir al fármaco especificidad de acción.

Dentro de estos sistemas de liberación de fármacos, los liposomas pueden ligarse a determinados tipos de tejidos y células, cualidad que se puede utilizar para incrementar al máximo la eficacia terapéutica del fármaco administrado y reducir al mínimo los efectos sistémicos no deseados<sup>2</sup>. Igualmente, pueden programarse para la liberación controlada de fármacos durante un periodo prolongado de tiempo<sup>3</sup>. Al ser químicamente similares a otras células que circulan en la sangre, son biológicamente compatibles con ellas y también fáciles de metabolizar por el organismo. Conjugados con anticuerpos se unen a las células diana con mayor avidez<sup>4</sup>. Constituyen un medio útil para proteger productos lábiles biológicamente activos, como proteínas, y las dosis eficaces de un fármaco se pueden reducir de forma espectacular cuando se administra en un preparado liposomal<sup>5</sup>.

Los liposomas se definen como vesículas microscópicas constituidas por bicapas fosfolípicas concéntricas alternando con compartimentos acuosos<sup>6</sup>. Estos vectores poseen una forma, estruc-

## INTRODUCTION

In the treatment of physiopathological processes, the administration of active principles should be achieved in such a way so as to ensure that the drug reaches the area of activity (biophase) at determined concentrations, and within effective therapeutic dosage ranges. Such dosage concentrations should remain constant throughout the time necessary to bring about changes in the physiopathological process. However, administration methods are inhibited by factors such as resistance to the drug, uptake of the drug by other cells, the inability of the drug to penetrate the cells or tissues under treatment, or a lack of specific tropism resulting in a distribution that is not only limited to the biophase, but also to other cells and tissues. Consequently, in order to obtain sufficient concentration levels at the target cells, it is necessary to administer relatively high doses, which can lead to undesirable toxicological and immunological effects<sup>1</sup>.

From a galenic point of view, the solution to such problems could lie in the chemical association of the active substance with an appropriate delivery preparation that endows the drug with the capability of recognizing determined types of cells (cytotropism) and specificity of action.

Within the different types of drug delivery systems, liposomes have the ability to bind to determined types of tissues and cells, and can therefore be used to both increase the therapeutic effectiveness of the drug and to minimise its undesirable effects<sup>2</sup>. Similarly, they can be programmed to achieve controlled delivery, over a longer period of time<sup>3</sup>. Due to a chemical similarity to other cells that circulate in the blood stream, they are biologically compatible and are also easily metabolised by the organism. On conjugation with antibodies, they bind more readily to target cells<sup>4</sup>, and constitute a useful medium for the protection of biologically active labile substances, such as proteins. Effective doses of a drug can be dramatically reduced when administered within a liposomal preparation<sup>5</sup>.

Liposomes are defined as microscopic vesicles made up of concentric phospholipid bilayers which alternate with aqueous compartments<sup>6</sup>. While these vectors present varying shapes, structures and sizes, their dimensions usually oscillate between 0.01 and 10 $\mu$ m. In consequence of their chemical structure, they possess the capacity to capture a

tura y tamaño diversos, aunque sus dimensiones suelen oscilar entre 0,01  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ . Dada su constitución, tienen la capacidad de captar una gran variedad de sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfifílicas<sup>7</sup>.

Al comprobarse el aumento de la disponibilidad biofásica del medicamento por su incorporación a liposomas, la aplicación terapéutica de estos sistemas ha ido desarrollándose paulatinamente y en los últimos años se han desarrollado liposomas como vectores físicos en terapia génica<sup>8,9</sup>, con doxorubicina<sup>10,11</sup>, antibacteriana (anfotericina B<sup>12</sup>, aminoglucósidos<sup>13</sup>).

Centrando la atención en las ventajas de su administración tópica<sup>14,15</sup> y concretamente en la terapia antiinflamatoria, la liberación dérmica controlada mediante liposomas, de diferentes antiinflamatorios de tipo esteroídico, ha posibilitado un incremento de los efectos farmacológicos, observándose una acumulación en tejidos cutáneos, mientras que los efectos secundarios disminuyeron<sup>16</sup>. En base a lo anterior, el objeto primordial de esta investigación es el desarrollo y estudio de la estabilidad de formulaciones alternativas para la administración de acetónido de triamcinolona, mediante su asociación química a un sistema transportador (liposomas). El agente seleccionado es un corticosteroide de amplio espectro, con actividad antiinflamatoria, antialérgica y antipruriginosa. Su incorporación a liposomas multilaminares podría mejorar su penetración a través de las diferentes barreras anatomofisiológicas, prolongando la dosis efectiva de fármaco en el lugar de acción (dermis y epidermis)<sup>17</sup>.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Material:*

Como componentes de las formulaciones, que serán la base de la matriz lipídica, se han elegido:

- Acetónido de Triamcinolona, lote 04K16FO, suministrado por Roig Farma-Fagron (Terrasa, España)
- L-alfa-fosfatidilcolina (PC) de huevo fresco, tipo X-E, lote 128H8003, suministrada por Sigma Chem. Co.
- Colesterol (CH), lote 0401203, suministrado por Roig Farma-Fagron (Terrasa, España)

great variety of active hydrosoluble, liposoluble or amphiphilic substances<sup>7</sup>.

After observing an increase in the biophasic availability of drugs after incorporation into liposome formulations, the therapeutic application of these delivery systems has been steadily on the increase. In recent years, liposomes have been developed as physical vectors in genic therapy<sup>8,9</sup>, with doxorubicin<sup>10,11</sup>, antibacterial treatment (amphotericin B<sup>12</sup>, aminoglucosides<sup>13</sup>).

With regard to topical administration<sup>14,15</sup>, especially in the case of anti-inflammatory therapy, the use of liposome formulations has enabled the controlled release of different steroidal anti-inflammatory substances on to skin, resulting in an increase in pharmacological effectiveness. This improvement is attributable to a greater accumulation of active principle within skin tissue, and is accompanied by a decrease in side effects<sup>16</sup>. On the basis of such findings, the main objective of this research work was to study and develop the stability of alternative formulations for the administration of triamcinolone acetonide, through its encapsulation into a liposome delivery system. This drug is a corticosteroid presenting a broad spectrum of activity as an anti-inflammatory, antiallergic and antipruritic agent. Its encapsulation into multilaminar liposomes improved penetration into different anatomophysiological barriers, and effective doses within the target area of treatment were maintained for longer periods of time (dermis and epidermis)<sup>17</sup>.

## MATERIAL AND METHODS

### *Material:*

The following components were chosen to make up the base formulation of the lipid matrix:

- Triamcinolone Acetonide, batch 04K16FO, supplied by Roig Farma Fagron (Terrasa, Spain).
- L-alfa-phosphatidylcholine (PC) from fresh eggs, Type X-E, batch 128H8003, supplied by Sigma Chem. Co.
- Cholesterol (CH), batch 0401203, supplied by Roig Farma-Fagron (Terrasa, Spain).
- Chloroform, batch 0311184, supplied by Roig Farma-Fagron (Terrasa, Spain).
- Deionised distilled water, Interapotheke (Murcia, Spain).

- Cloroformo, lote 0311184, suministrado por Roig Farma-Fagron (Terrasa, España)
- Agua destilada desionizada, Interapothek (Murcia, España)

#### Métodos:

Todos los resultados de este estudio se han sometido a un tratamiento estadístico consistente en un análisis de varianza o ANOVA, con el cálculo de las varianzas intra e intergrupos y el test de Fisher (LSD) para un nivel de confianza del 95,0%. En el caso de los datos referentes a grado de captación, todos los pares de valores medios comparados han presentado diferencias significativas también para un nivel de confianza del 95,0%.

#### 1.- Formulaciones de liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona

Se han diseñado seis formulaciones de liposomas, cuya constitución, proporciones molares y cantidades de cada componente, expresadas en mmoles/100ml y mg/100ml se muestran en la tabla 1 (formulaciones con fosfatidilcolina) y (formulaciones con fosfatidilcolina y colesterol).

#### Methods:

All the results of this study were subject to statistical treatment consisting of variance analysis (ANOVA) with the calculation of intra variance and intergroups and the Fisher's LSD test at a confidence level of 95.0%. With regard to encapsulation data, all the compared average pair values presented significant differences for 95.0% confidence levels.

#### 1. – Multilaminar liposome formulations as triamcinolone acetonide delivery system.

Six liposome formulations were designed. The molar proportions and quantities of each component, expressed in moles/100ml and mg/100ml, are shown in table 1 for both phosphatidylcholine and phosphatidylcholine/cholesterol formulations.

**TABLA 1.** Composición de los liposomas y Evaluación del grado de captación de Acetónido de Triamcinolona por los liposomas (n=6).

**TABLE 1.** Liposome composition and degree of Triamcinolone acetonide encapsulation (n=6).

Nº	Proporción Molar PC:CH:AT Molar proportion PC:CH:TA	mmoles/ 100ml PC:CH:AT mmoles/ 100ml PC:CH:TA			mg/ 100ml PC:CH:AT mg/ 100ml PC:CH:TA			$\mu\text{g}$ AT captados/ mg PC $\mu\text{g}$ of encapsulated TA mg PC	% LIBRE % of non-encapsulated TA	%CAPTADO % of encapsulated TA
1	1:0:1	0.230	-	0.230	181.15	-	100	499.09±10.93	9.59±1.97	90.41±1.97
2	2:0:1	0.460	-	0.230	362.30	-	100	241.73± 4.25	12.42±1.54	87.58±1.54
3	3:0:1	0.690	-	0.230	543.45	-	100	164.95±7.92	10.36±4.30	89.64±4.30
4	1:0.5:1	0.230	0.115	0.230	181.15	44.46	100	445.60±10.17	19.28±1.84	80.72±1.84
5	2:1:1	0.460	0.230	0.230	362.30	88.92	100	287.83± 5.06	21.08±1.83	78.92±1.83
6	3:1.5:1	0.690	0.345	0.230	543.45	133.38	100	139.17± 6.53	24.37±3.54	75.63±3.54

PC: Fosfatidilcolina, CH: Colesterol, AT: Acetónido de Triamcinolona.

PC: Phosphatidylcholine, CH: Cholesterol, TA: Triamcinolone acetonide.

Se estudia la influencia ejercida por el fosfolípido seleccionado, para ello se prepararon una serie de suspensiones liposomiales, con una cantidad de acetónido de triamcinolona constante, equivalente a 0,230 mmoles/100ml, y cantidades variables de fosfatidilcolina de huevo (PC) desde una concentración de 0,230 mmoles/100ml hasta 0,690mmoles/100ml. Asimismo, y al objeto de obtener la máxima incorporación del principio activo y la mejor estabilidad, se elaboraron formulaciones de liposomas de fosfatidilcolina de huevo, que contenían colesterol (CH) en su matriz lipídica, a una concentración molar del 50% con relación a la proporción de fosfolípido.

## 2.-Elaboración de los liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona

Los liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona (AT) han sido obtenidos, por el método de Bangham et al. (1974)<sup>18</sup>, intentándose normalizar las condiciones bajo las cuales se ha llevado a cabo la elaboración.

Este método, consta de diferentes fases. La primera fase consiste fundamentalmente en la solubilización de todos los componentes de la pared lipídica. El disolvente empleado debe ser volátil, a fin de permitir su eliminación durante la segunda fase del método. Como disolvente orgánico volátil se ha utilizado el cloroformo en cantidad suficiente para la total disolución de los lípidos. Como resultado se obtiene una solución clorofórmica del fosfolípido (fosfatidilcolina de huevo) y del resto de los componentes de la bicapa lipídica (colesterol). El acetónido de triamcinolona, dada su liposolubilidad, es incorporado en ésta etapa a la solución orgánica. La evaporación del disolvente se efectúa en un rotavapor Büchi (modelo R-110), operando a vacío y a la máxima velocidad de giro del aparato, prolongándose el proceso el tiempo necesario hasta la total desecación de los lípidos, y formación de una película lipídica adherida a las paredes del matraz. Las condiciones de trabajo permanecen constantes en todos los casos, siendo la temperatura del baño termostático de 37°C<sup>19,20</sup>. Finalmente, se adiciona la fase acuosa del sistema constituida por agua. Por agitación continua durante 30 minutos a 300 r.p.m, se produce la hidratación de la película lipídica, que se desprende de las paredes del recipiente, y la formación de una suspensión de liposomas; manteniéndose en reposo durante

In the study of the influence of the phospholipid, a series of liposome suspensions were prepared, with a constant quantity of triamcinolone acetone of 0.230 mmoles/100ml, and variable quantities of egg phosphatidylcholine (PC), from 0.230 mmoles/100ml to 0.690mmoles/100ml. Similarly, in an attempt to encapsulate as much active principle as possible at the highest degree of stability, liposome formulations were made with egg phosphatidylcholine, containing cholesterol (CH) in lipid matrix, at a molar concentration of 50% in relation to phospholipid.

## 2.-Preparation of Multilaminar liposome as triamcinolone acetone delivery system.

The method used for the encapsulation of triamcinolone acetone into multilaminar liposomes was that described by Bangham et al (1974)<sup>18</sup>, in which an attempt was made to standardise the conditions under which the process was carried out.

This method consists of several different phases. The first phase consists of the solubilizing of all components contained in the lipid wall. The solvent used should be volatile, in order to permit its elimination during the second phase of the method. Chloroform was used, as a volatile organic solvent, in sufficient quantities so as to completely dissolve lipids, yielding a chloroform solution of phospholipid (egg phosphatidylcholine) and the remaining components of the lipid bilayer (cholesterol). Given that triamcinolone acetone is liposoluble, it could then be added to this organic solution. Evaporation of the solvent was performed using a Büchi Rotavapor (model R-110), operating under vacuum at maximum speed, for the time necessary to achieve complete drying of the lipids, and the formation of a lipid film clinging to the walls of the matrix. Working conditions remained constant throughout the whole process, with thermostatic bath temperatures at 37°C<sup>19,20</sup>, until the aqueous phase of the system (water) was finally added. Hydration of the lipid film was brought about through continuous stirring for 30 minutes at 300 r.p.m., during which the lipid film fell from the walls of the receptacle, forming a liposome suspension, which was left to stand for 24 hours at 4°C, in order to facilitate vesicle formation and growth.



24 horas a 4°C, para favorecer el crecimiento y formación de las vesículas.

### 3.-Estudio de encapsulación del acetónido de triamcinolona

La determinación del grado de captación de acetónido de triamcinolona (AT), por parte de liposomas multilaminares, se ha efectuado mediante valoración espectrofotométrica de la fracción de agente no incorporado a estos sistemas, resultante de la separación por centrifugación durante 10 minutos a 1000 r.p.m. En base a dichos valores, y conocida la concentración inicial de agente, se calcula los porcentajes de fármaco captado.

### 4.- Estudio de Estabilidad

Se han elaborado dos series de muestras por formulación, una de ellas se mantiene a temperatura ambiente (20-25°C) y la otra a temperatura de refrigeración (4-6°C), protegidas todas de la acción de la luz.

El periodo de estudio ha sido de 90 días, determinándose a intervalos de 15 días la liberación o pérdida de agente captado por parte de las vesículas lipídicas.

Por diferencias entre el porcentaje encapsulado en el día 0 (momento de la elaboración) y los obtenidos en días sucesivos, se determina la pérdida de acetónido de triamcinolona encapsulado en función del tiempo.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1.-Estudio de encapsulación del acetónido de triamcinolona

En la tabla 1 se incluyen los valores medios de las 6 determinaciones efectuadas para cada una de las 6 fórmulas ensayadas, incluyéndose las desviaciones estándar de los mismos. Dichos valores corresponden a los microgramos de acetónido de triamcinolona retenidos por miligramo de lípido, % de principio activo libre, así como el % captado, que constituyen la expresión cuantitativa del proceso de encapsulación de acuerdo con la terminología propuesta por Puisieux et al. en 1985<sup>1</sup>, y basada en las definiciones aportadas por Hunt et al. en 1981<sup>20</sup>.

### 3.-Triamcinolone acetonide Encapsulation

The extent to which triamcinolone acetonide had been encapsulated into the multilaminar liposomes was determined through a spectrophotometric evaluation of the non-encapsulated fraction, which had been separated through centrifugation for 10 minutes at 1000 r.p.m.. The difference between this and initial concentration values, permitted the percentage of encapsulated drug to be calculated.

### 4.- Stability study

Two series of samples per formulation were prepared. One of which was maintained at room temperature (20-25°C) and the other under refrigeration (4-5°C). Both series were protected from light.

Throughout a period of 90 days, the release or loss of the encapsulated agent was determined at intervals of 15 days.

The difference between initial encapsulated triamcinolone acetonide and that found on successive days throughout the testing period provided the basis from which the rate of loss could be determined.

## RESULTS AND DISCUSSION

### 1.- Encapsulation study of triamcinolone acetonide

Table 1 includes the average encapsulation values obtained for the 6 tested formulations, including their standard deviations. These values show the percentages of retained micrograms of triamcinolone acetonide per milligram of lipid, and the percentages of free active principle, giving a quantitative expression of the encapsulation process, in accordance with the terminology proposed by Puisieux et al in 1985<sup>1</sup>, based on the definitions given by Hunt et al. in 1981<sup>20</sup>.

The results obtained in these first studies reveal how an increase in the phospholipid concentration from 0.230 mmoles/100ml to 0.690 mmoles/100ml, produces a change in the percentage of encapsulated agent. Encapsulation was very high in the three formulations tested with average values ranging from between 75.63% to 90.41% (table 1).

Los resultados obtenidos en estos primeros estudios pusieron de manifiesto como al aumentar la concentración de fosfolípido de 0,230 mmoles/100ml a 0,690 mmoles/100ml, variaba, el porcentaje de agente captado. El rendimiento resultó muy elevado en las tres formulaciones ensayadas con valores medios que oscilaban entre el 75,63% y el 90,41% (tabla 1).

La elevada capacidad de incorporación de acetónido de triamcinolona por parte de éstos liposomas es consecuencia de la presencia de gran variedad de ácidos grasos insaturados en la composición de la fosfatidilcolina de huevo, así como de su baja temperatura de transición, de tal manera que los lípidos se encuentran en estado (cristal-líquido) a la temperatura de trabajo. En general, la encapsulación de sustancias activas lipofílicas (como es el agente objeto de estudio) se ve favorecida cuando las bicapas lipídicas presentan una cierta fluidez<sup>22,23</sup>.

De las tres fórmulas ensayadas, la número 1 aportó un mayor rendimiento económico, al conseguirse una elevada captación de principio activo con menor concentración de fosfolípido.

Asimismo estas investigaciones previas mostraron como la adición de 0,115 mmoles/100ml de colesterol (fórmula número 4) a los liposomas PC:AT (1:1) provocaba una reducción en la captación (80,72% captado). Similares variaciones se apreciaron en las muestras número 5 y 6 (78,92% y 75,63%), ambas con una concentración del 50% de colesterol con respecto a la cantidad de fosfatidilcolina.

El descenso provocado en la cantidad captada por la inclusión de colesterol, podría ser consecuencia de su orientación en la zona hidrófoba de la matriz liposomal, lugar de localización del agente estudiado. Aunque el modo de interacción con la bicapa lipídica no está totalmente aclarado, el colesterol se alinea paralelamente a las cadenas grasas del fosfolípido con el grupo hidroxilo del anillo esteroídico orientado hacia el interior de la bicapa. La disposición espacial del OH en posición 3 parece ser decisiva en la interacción<sup>23,24</sup>.

No obstante, las formulaciones ensayadas que contienen colesterol también han aportado una tasa de encapsulación bastante elevada.

Asimismo en las tres fórmulas con colesterol, el porcentaje captado disminuye a medida que aumenta la concentración de fosfatidilcolina.

The great capacity of these liposomes to encapsulate triamcinolone acetonide is attributable to the presence of a great variety of unsaturated fatty acids in the composition of the egg phosphatidylcholine, and its low transition temperature, meaning that the lipids are found in a liquid crystal state at working temperature. In general, the encapsulation of lipophilic active substances (as in the case of the agent under study in this work) is facilitated when the lipid bilayers present a certain fluidity<sup>22,23</sup>.

Of the three formulations tested, formulation 1 was found to be more economical, given that higher levels of encapsulation were obtained at lower concentrations of phospholipid.

Similarly, this preliminary research work showed that the addition of 0.115 mmoles/100ml of cholesterol (formula 4) to the PC:AT liposomes (1:1) brought about a reduction in encapsulation (80.72%). Similar variations can be observed in samples 5 & 6 (78.92% & 75.63%), which both contained a concentration of 50% cholesterol with respect to the quantity of phosphatidylcholine.

The decrease in encapsulation after the incorporation of cholesterol, could be attributable to its orientation in the hydrophobic area of the liposome matrix, which is where the active principle is located. Although the interaction process with the lipid bilayer is not totally clear, it can be seen that cholesterol is aligned in parallel with the phospholipid fatty acid chains with the hydroxyl group of the steroidal ring orientated towards the interior of the bilayer. The spatial disposition of OH in position 3 seems to be a decisive factor in this interaction<sup>23,24</sup>.

However, the formulations that contain cholesterol also produced fairly high levels of encapsulation.

Similarly, in the three formulations with cholesterol, the percentage of encapsulated agent decreases as phosphatidylcholine concentrations increase.

## 2.-Estudio de Estabilidad

El estudio de la estabilidad de liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona ha proporcionado una serie de valores de porcentaje captado y perdido en función del tiempo (tablas 2 y 3). La figura 1 (fórmulas 1 a 6) corresponde a la representación gráfica del % de acetónido de triamcinolona que se mantiene encapsulado en función del tiempo, la temperatura y fórmula.

## 2.- Stability study

The stability study of multilaminar liposomes as a triamcinolone acetonide delivery system provided a series of percentage values for encapsulated drug and its loss in terms of time (tables 2 and 3). Figure 1 (formulas 1-6) gives a graphic representation of the percentage of encapsulated agent in terms of time, temperature and formulation.

**TABLA 2.** % de Acetónido de Triamcinolona libre y encapsulado por los liposomas.

**TABLE 2.** % of encapsulated and free Triamcinolone acetonide by liposomes.

FORMULA	1		4		2		5		3		6	
Temperatura Temperature	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
Días	% AT Captado/Libre % of encapsulated/freeTA											
0	90.74	90.3	89.85	88.07	83.83	82.50	81.50	78.39	72.31	67.00	64.60	63.73
	9.26	9.70	10.15	11.93	16.17	17.50	18.50	21.61	27.69	33.00	35.40	36.27
15	85.86	84.53	89.85	87.18	81.17	79.40	81.05	77.95	63.90	61.22	63.73	63.29
	14.14	15.47	10.15	12.82	18.83	20.60	18.95	22.05	36.10	38.78	36.27	36.71
30	85.86	84.53	89.85	86.74	81.17	79.40	80.60	77.95	63.90	60.78	63.29	62.84
	14.14	15.47	10.15	13.26	18.83	20.60	19.40	22.05	36.10	39.22	36.71	37.16
45	85.86	83.20	89.85	85.85	81.17	77.18	80.60	77.50	63.44	60.78	62.40	59.30
	14.14	16.80	10.15	14.15	18.83	22.82	19.40	22.50	36.56	39.22	37.60	40.70
60	84.09	78.77	88.96	85.85	79.40	76.79	80.60	77.50	62.11	59.45	61.07	53.97
	15.91	21.23	11.04	14.15	20.60	23.26	19.40	22.50	37.89	40.55	38.93	46.03
75	84.09	74.78	88.96	85.85	77.62	76.30	78.83	77.50	61.67	59.45	59.30	53.97
	15.91	25.22	11.04	14.15	22.38	23.71	21.17	22.50	38.33	40.55	40.70	46.03
90	69.02	68.57	86.3	83.19	74.52	71.41	73.07	69.52	61.67	55.46	57.08	55.53
	30.98	31.43	13.7	16.81	25.48	28.59	26.93	30.48	38.33	44.54	42.92	46.47

**TABLA 3.** % Acetónido de triamcinolona perdido por los liposomas en función del tiempo.

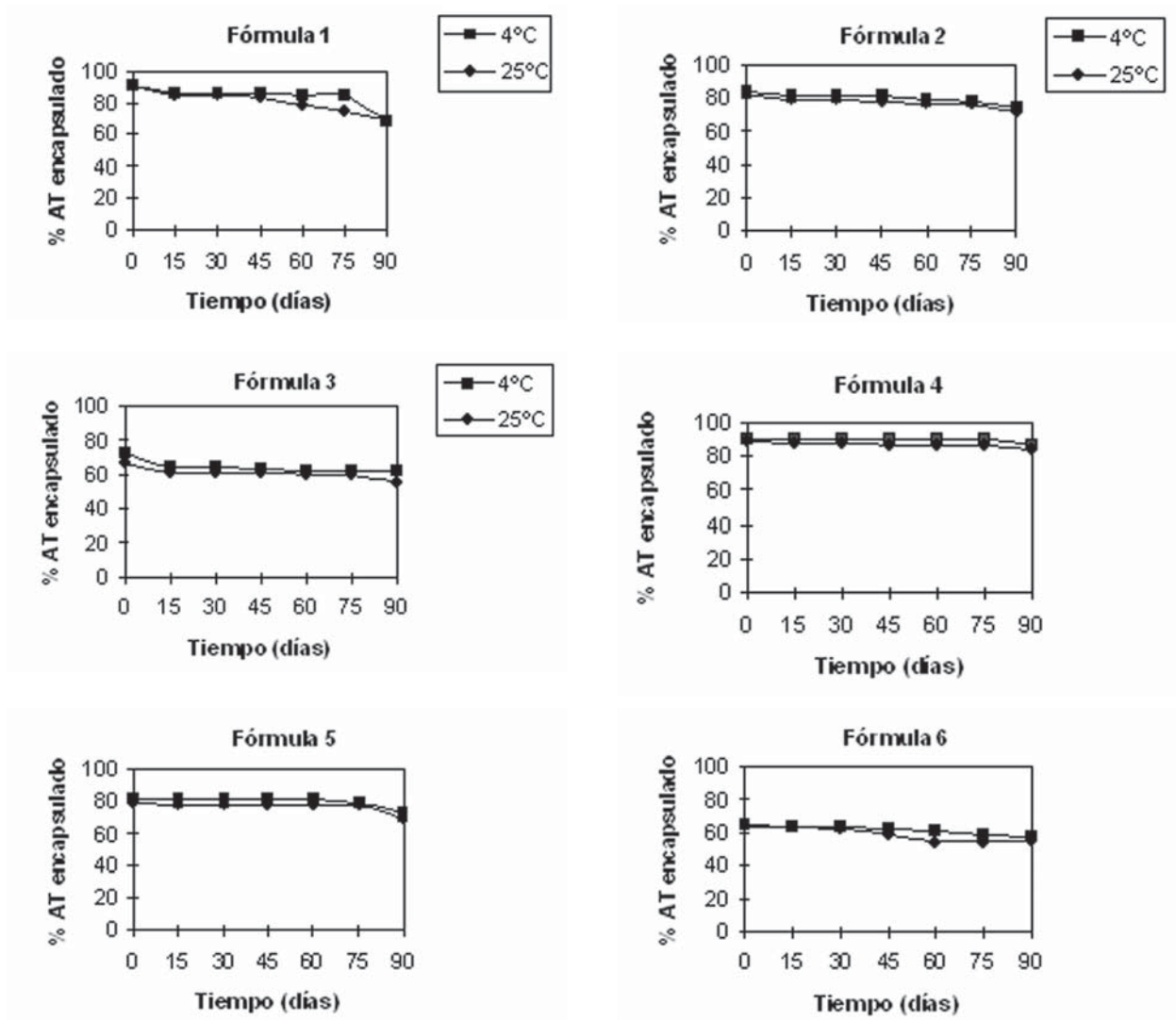
**TABLE 3.** % of Triamcinolone Acetonide loss over time.

FORMULA FORMULA	1		4		2		5		3		6	
Temperatura Temperature	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
Días Days	% AT perdido % of lost TA											
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	4.88	5.77	0	0.89	2.66	3.10	0.45	0.44	8.41	5.78	0.87	0.44
30	4.88	5.77	0	1.33	2.66	3.10	0.9	0.44	8.41	6.22	1.31	0.89
45	4.88	7.1	0	2.22	2.66	5.32	0.9	0.89	8.87	6.22	2.2	4.43
60	6.65	11.53	0.89	2.22	4.43	5.77	0.9	0.89	10.2	7.55	3.53	8.2
75	6.65	15.52	0.89	2.22	6.21	6.2	2.67	0.89	10.64	7.55	5.3	9.76
90	21.72	21.73	3.55	4.88	9.31	11.09	8.43	8.87	10.64	11.54	7.52	9.76



**FIGURA 1.** % de Acetónido de Triamcinolona que se mantiene encapsulado en función del tiempo, la temperatura y fórmula.

**FIGURE 1.** % of encapsulated Triamcinolone acetonide, in accordance with time, temperature and formula.



Se comparan los valores obtenidos para cada fórmula, en base a su composición, tiempo ensayado y temperatura de conservación, obteniendo en todos los casos diferencias significativas.

En base a los datos aportados por este estudio de estabilidad, las muestras conservadas a temperatura inferior a la ambiente (4-6°C) han experimentado de forma general, una pérdida o fuga estadísticamente significativa menor del agente captado inicialmente por las vesículas lipídicas, a lo largo del periodo de estudio (90 días). Dicha reducción en el porcentaje de acetónido de triamcinolona perdido se ha constatado en las seis formulaciones ensayadas.

Del análisis de la influencia de los componentes básicos sobre la estabilidad se deduce que

On comparison of the values obtained for each formula, significant differences in composition, time and storage temperature can be observed.

This stability study shows that throughout the 90 day study period, losses of active principle were significantly lower in all of the six samples that were stored under conditions of refrigeration (4-5°C).

From the analysis of the influence of the basic components on stability, the formulae containing higher concentrations of phospholipid (3 & 6) showed a lower rate of loss. The formula containing phosphatidylcholine at a molar ratio of 1:1 proved to be more economical, given that 90.4% of active principle was encapsulated with lower concentrations of phospholipid. However,

las fórmulas elaboradas con mayor concentración fosfolipídica (3 y 6) presentan una cantidad más elevada de agente libre al final del estudio. La fórmula elaborada con fosfatidilcolina y fármaco en relación molar 1: 1 es la que aporta un mayor rendimiento económico, al conseguirse una elevada captación de principio activo (90.4%) con menor concentración de fosfolípido. Sin embargo destaca la formulación PC: CH: AT en relación molar 1: 0.5: 1 (fórmula 4) conservada en frío, por su capacidad de retención del acetónido de triamcinolona, con pérdidas a los 90 días inferiores al 5%; frente a la fórmula 1 que, aunque presenta mayor grado de captación, sus pérdidas son más elevadas. Es decir, los liposomas con colesterol (fórmulas 4, 5 y 6) pierden menor cantidad de corticoide retenido, en comparación con aquellos que no lo incorporan en su formulación (fórmulas 1, 2 y 3), tanto a temperatura ambiente como de refrigeración.

Los datos aportados por el estudio de estabilidad ponen de manifiesto la influencia de la temperatura de conservación sobre la integridad del sistema. Así, los liposomas mantenidos a baja temperatura (4-6°C) poseen una estabilidad mayor, que las muestras conservadas a temperatura ambiente (20-25°C), con menor difusión prematura del principio activo captado a través de la pared.

the PC:CH:TA formulation (formular 4) with a molar ratio of 1:0.5:1 kept under cold storage conditions, presented lower losses of triamcinolone acetonide at 90 days (5%) in comparison with formula 1, which in spite of higher initial encapsulation values, was subject to greater losses over time. Furthermore, under both room temperature and cold storage conditions, formulations containing cholesterol (formulas 4, 2 & 6) were subject to lower corticoid losses than those that did not.

The data provided by this stability study shows that storage temperature has an important role to play. Liposomes kept at low storage temperatures (4-5°C) present higher stability and lower rates of loss of encapsulated corticoid in comparison with those stored at room temperature (20-25°C).

## BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY

1. Puisieux F, Poly PA. Problèmes technologiques posés par l'utilisation des liposomes comme vecteurs de substances médicamenteuses, encapsulation, stérilisation, conservation In "Les liposomes, applications thérapeutiques" Puisieux F, Delattre J. (Eds). Technique &. Documentation, Paris, 1985.
2. Banciu M, Schiffelers RM, Fens MH, Metselaar JM, Storm G. Anti-angiogenic effects of liposomal prednisolone phosphate on B16 melanoma in mice. *J. Control. Release* 2006; 113(1):1-8.
3. Jain SK, Jain RK, Chourasia MK, Jain AK, Chalasani KB, Soni V, Jain A. Design and development of multivesicular liposomal depot delivery system for controlled systemic delivery of acyclovir sodium. *AAPS Pharm. Sci. Tech* 2005; 06(01): E35-E41.
4. Laginha K, Mumbengegwi D. Liposomes targeted via two different antibodies: assay, B-cell binding and cytotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1711: 25-32.
5. Maierhofer G. Introducción a una Nueva Tecnología y Descripción de Técnicas Preparativas. *Farm. Clín.* 1988; 5: 658-680.
6. Díez O. Aplicación de nuevos sistemas de liberación prolongada en cosmética. *NCP* 2004; 276: 5-22.
7. Couvreur P, Kante B, Lenaerts V, Guiot P, Roland M. Tissue distribution of 3H-actinomycin D adsorbed on Polybutylacrylate Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 1980; 7: 45-53.
8. Zhang C, Tang N, Liu X, Liang W, Xu W, Torchilin VP. siRNA-Containing liposomes modified with polyarginine silence the targeted gene. *J. Control. Release* 2006; 112(2): 229-239.
9. Chiu SJ, Liu S, Perrotti D, Marcucci G, Lee RJ. Efficient delivery of a Bcl-2-specific antisense oligodeoxyribonucleotide (G3139) via transferring receptor-targeted liposomes. *J. Control. Release* 2006; 112(2): 199-207.
10. Chou HH, Wang KL, Chen CA, Wei LH, Hsieh CY, Yang YC, Twu NF, Chang TC, Yen MS. Pegylated liposomal doxorubicin (Lipo-Dox) for platinum-resistant or refractory epithelial ovarian carcinoma: A Taiwanese gynecologic oncology group study with long-term follow-up. *Gynecol Oncology* 2006; 101(3):423-428.

11. Frenkel V, Etherington A, Greene M, Quijano J, Xie J, Hunter F, Dromi S, Li KC. Delivery of liposomal doxorubicin (doxil) in a breast cancer tumor model: investigation of potential enhancement by pulsed-high intensity focused ultrasound exposure. *Acad. Radiology* 2006; 13(4): 469-79.
12. Cagnoni J. Liposomal amphotericin B versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of persistently febrile neutropenic patients. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 2002; 49: 81-86
13. Schiffelers R, Storm G, Bakker-Woudenberg I. Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 48: 333-344.
14. Kumar R, Katare OP. Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2004; 7: 252-259.
15. Elzainy AW, Gu X, Simons FE, Simons KJ. Cetirizine from topical phosphatidylcholine-hydrogenated liposomes: evaluation of peripheral antihistaminic activity and systemic absorption in a rabbit model. *AAPS J.* 2004; 6 (3): article 18.
16. Cevc G, Blume G, Schatzlein A. Transfersomers mediated. Transepidermal delivery improves the regio-specificity and biological-activity of corticosteroids in-vivo. *J. Control. Release* 1997; 45: 211-226.
17. Mezei M, Gulasekharan V. Liposomes, a Selective Drug Delivery System for the Topical Route of Administration. I, Lotion Dosage form. *Life Sci.* 1980; 26: 1473-1477.
18. Bangham AD, Hill MW, Miller NGA. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes In "Methods in membrane biology", publié par Korn E.D. Plenum Press, New York 1974; 1: 1-68.
19. Puisieux F. Les liposomes: classification et obtention. *Labo. Pharma. Probl. Tech.* 1978; 281: 899-904.
20. Medina MM, Cerezo A, Sánchez-Morcillo J, Fernández-Feijoo MA. Liposomas transportadores de mebendazol: elaboración y estudio de la estabilidad y liposomas transportadores de vitamina b<sub>6</sub>: elaboración y caracterización. XXIX Congreso de A.E.F.H.. tomo I. Alicante 1984; 383-391, 399-408.
21. Hunt CA, Tsang S. Tocopherol retards autoxidation and prolongs the shelf life of liposomes. *Int. J. Pharm.* 1981; 8: 101-110.
22. Vasson MP, Colombat A, Madelmont JC, Moreau MF, Godeneche D, Delattre J. Etude comparative de l'encapsulation dans les liposomes de nitroso-ureas. Premier Congrès Européen de Biopharmacie et Pharmacocinetique. Vol. I. Clermont-Ferrand 1981; 381.
23. Duforc J. Phyco-chimie des Phospholipides In "Les liposomes, applications thérapeutiques", Puisieux F. et Delattre J. (Eds), Technique & Documentation, Paris 1985; 1-10.
24. Guzmán M. "Los liposomas, vehiculos de medicamentos cardiotónicos. Tesis Doctoral Facultad de Farmacia de Alcalá de Henares 1995.
25. Joshi MR, Misra A. Liposomal budesonide for dry powder inhaler: preparation an stabilization. *Pharm. Sci. Tech.* 2001; 2(4).
26. Virtanen JA, Ruonala M, Vauhkonen M, Somerharju P. Lateral organization of liquid-crystalline cholesterol-dimyristoyl-phosphatidylcholine bilayers. Evidence for domains with hexagonal and centered rectangular cholesterol superlattices. *Biochemistry* 1995; 34: 11568-11581.
27. Mc Mullen JN, Newton DW, Becker CH. Pectin-gelatin complex cohacervates part 2. Effect of microemcapsulates sulfamerazine on size, morphology, recovery and straction of water dispersible microglobules. *J. Pharm. Sci.* 1984; 73: 1799-1803.