

ESTUDIO *EX VIVO* DE LA LIBERACIÓN TRANSDÉRMICA DE ENALAPRIL

EX VIVO STUDY OF ENALAPRIL TRANSDERMAL RELEASE

Lucía Lhez, Nora B. Pappano y Nora B. Debattista
Universidad Nacional de San Luis, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia,
Lavalle 1155, 5700 San Luis-Argentina
(e-mail: debattis@gmail.com)

Recibido: 07/07/2010 - Evaluado: 07/08/2010 - Aceptado: 02/09/2010

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el comportamiento *ex vivo* de una formulación de enalapril maleato para su administración por vía transdérmica, utilizando piel de oreja de cerdo. Los experimentos se realizaron en celdas de difusión vertical tipo Franz. El principio activo fue formulado en una dispersión de carbopol. A partir de las cantidades acumuladas de enalapril en el compartimento receptor, se evaluó el flujo y el coeficiente de permeabilidad. Con el fin de optimizar la penetración del principio activo, se investigó el efecto de L-mentol como potenciador de la permeabilidad. Se determinó que este compuesto contribuye favorablemente a la penetración de enalapril a través de la piel y que los parámetros de permeabilidad, flujo y coeficiente de permeabilidad, alcanzan sus máximos valores cuando L-mentol está presente en un 3,82% en la formulación enalapril/carbopol.

ABSTRACT

In the present work it was studied the *ex vivo* behaviour of enalapril maleate formulation by transdermal administration route, using pig ear skin. Experiments were performed in Franz type vertical diffusion cells and the active principle was formulated in carbopol dispersion. The enalapril cumulative quantities in the receptor compartment allowed evaluation of flux and permeation coefficient. The L-menthol effect as permeation enhancer was investigated to optimize drug permeation. It was found that this compound contributes favourably to enalapril penetration through skin. The permeation parameters, flux and permeation coefficient, reached their maximum values when L-menthol concentration in enalapril/carbopol formulation was 3.82%.

Palabras clave: enalapril; L-mentol; permeabilidad transdérmica; piel de cerdo
Keywords: enalapril; L-menthol; transdermal permeation; pig skin

INTRODUCCIÓN

Es ampliamente conocida la importancia de la terapia a largo plazo de la hipertensión arterial con agentes inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), tanto por su efectividad como por su buena compatibilidad. Entre ellos, captopril es una sustancia muy hidrófila, activa en forma inalterada y cuya biodisponibilidad por vía oral asciende aproximadamente al 70 %. Agentes inhibidores de ACE más recientes, como enalapril, son profármacos lipófilos de la forma activa. La biodisponibilidad oral de estos está situada sin embargo en un valor siempre más bajo que el del captopril. Asimismo, las sustancias con pequeña biodisponibilidad son muy dependientes de la respectiva capacidad de metabolización de los pacientes y los niveles en plasma resultantes experimentan una variación muy alta, conduciendo a evoluciones del efecto imposibles de calcular. Para evitar estos inconvenientes es deseable administrar el fármaco por vía transdérmica y de esta manera lograr un aporte sistémico reproducible y confiable.

Enalapril es uno de los fármacos empleados en el tratamiento de la hipertensión arterial, producida por cambios hemodinámicos a niveles macro y microvasculares. Actúa mediante la reducción de los niveles plasmáticos y tisulares de angiotensina II, lo que conduce a la vasodilatación arteriovenosa y a la disminución de los niveles plasmáticos de noradrenalina y vasopresina (Galiana y Gil, 1997).

La vía transdérmica constituye una alternativa práctica y segura para aquellos medicamentos de administración con cortos intervalos entre dosis o inconvenientes para la administración oral como baja biodisponibilidad, vida media corta o que producen irritabilidad gástrica. Debido a que un alto porcentaje de la población de edad avanzada sufre de hipertensión y estos pacientes comúnmente padecen además irritabilidad gastrointestinal, se propone disminuir el malestar provocado por el suministro de medicamentos por vía oral mediante la utilización de la vía transdérmica.

La absorción percutánea está relacionada con la transferencia del principio activo desde la superficie de la piel a través del estrato córneo (SC) bajo la influencia de un gradiente de concentración, y su posterior difusión a través de todas las capas de la piel hasta alcanzar la microcirculación.

Los perfiles de permeación pueden ser afectados por la alteración de la propiedad de barrera de la piel. En la literatura se sugieren mecanismos que justifican esta modificación: reducción de la resistencia de la piel por disrupción de las regiones lipídicas del empaquetamiento compacto del estrato córneo; incremento de la partición piel / vehículo del fármaco o incremento del transporte de solvente dentro o a través de la piel (Pathan y Setty, 2009; Thong et al., 2007; Benson, 2005). El SC constituye el principal obstáculo a vencer para mejorar la penetración transepitelial de los fármacos (Barry, 2004a; Barry, 2004b), por lo que se hace necesario el uso de potenciadores, sustancias que permiten optimizar los sistemas de administración transdérmica (Williams y Barry, 2004).

El ordenamiento molecular de los lípidos intercelulares en el estrato córneo da lugar a estructuras lamelares con un empaquetamiento específico. Estudios de difracción de Rayos X de modelos *in vitro* que simulan lamelas lipídicas, permitieron elucidar las interacciones entre promotores de la permeación y los lípidos de la piel, determinando la existencia de un aumento de la distancia entre las capas de la estructura lamelar y una disminución del empaquetamiento ortorrómbico de las cadenas hidrocarbonadas.

Los terpenos limoneno, cineol, mentol y carvona, entre otros, han sido investigados como potenciadores químicos comprobando que aumentan la penetración de principios activos a través de la piel con relativamente baja irritación (Olivella et al., 2007; Amnuait et al., 2005). El descenso de la temperatura de transición de las endotermas de calorimetría de barrido diferencial en presencia de terpenos, indica que estos interactúan con los lípidos del SC y fluidifican la bicapa lipídica. Estos compuestos actúan rompiendo las uniones hidrógeno intermoleculares fuertes de los componentes del SC, formando en su lugar débiles uniones hidrógeno terpeno-lípidos. Estas rupturas permiten una mayor hidratación de las cabezas polares de los lípidos y formación de

nuevos caminos polares. El significativo incremento en los niveles de hidratación del SC en presencia de terpenos ha sido corroborado además por estudio de FTIR (Jain et al., 2002; Narishetty y Panchagnula, 2004.; Watanabe et al., 2009).

La piel de cerdo representa un modelo apropiado para predecir el comportamiento de un sistema de administración transdérmica, debido a que posee similitudes histológicas y estructurales con la piel humana (Godin y Touitou, 2007; Cilurzo et al., 2007).

En el presente trabajo se realizó un estudio *ex vivo* de la liberación transdérmica de una formulación de enalapril a través de piel de cerdo, determinando valores de flujo y coeficiente de permeación. A través de estos parámetros se analizó además el efecto de L-mentol, con el fin de optimizar la penetración del principio activo.

METODOLOGÍA

Materiales

Maleato de enalapril, $C_{20}H_{28}N_2O_5$, PM = 376,4 g/mol (provisto por el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos, UNSL), carbopol 940 (Parafarm®), trietanolamina (Parafarm®), fosfato de potasio monoácido anhidro (Biopack)*, fosfato de potasio diácido (Merck)*, cloruro de sodio (Biopack)*, L-mentol (Parafarm®), piel de cerdo dermatomizada, muestreador automático Microette (Hanson-Research), espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-160A). *Indica que son ingredientes de buffer salino de fosfatos pH = 7,4.

Métodos

Las formulaciones se prepararon disolviendo maleato de enalapril en agua agregando carbopol 940, agente gelificante, con agitación continua hasta obtener un gel cuya consistencia se ajustó con trietanolamina. Para las experiencias con L-mentol como promotor, éste se disolvió en 0,2 mL de etanol, adicionándolo posteriormente a la solución maleato de enalapril/agua completando la preparación del gel de acuerdo a lo anteriormente descrito. La proporción de principio activo fue de 0,148 gramos por cm^3 de gel, suficiente para asegurar una liberación constante durante el experimento. Las concentraciones p/p de L-mentol ensayadas fueron 1,20%; 2,50%; 3,25%; 3,82%; 4,03% y 5,00%.

Los estudios de permeación se realizaron utilizando piel de oreja de cerdo blanco extraída, previa eutanasia, de especímenes de aproximadamente 75 días de edad. La piel fue rasurada y posteriormente dermatomizada separando la epidermis de las demás capas. Se cortó en porciones de tamaño adecuado, determinando su espesor con un micrómetro Fischer Dualscope MP0R y se almacenó a $-8\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

Las experiencias de permeación se llevaron a cabo por triplicado en un muestreador automático a $32 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, utilizando celdas de difusión vertical tipo Franz que constan de un compartimento donador y uno receptor. Entre ambos compartimentos se coloca la membrana, en este caso piel de cerdo, a través de la cual debe difundir el principio activo. La superficie activa de permeación fue de $1,767\text{ cm}^2$. En el compartimento donador se colocaron 0,246 g ($0,265\text{ cm}^3$) de la formulación bajo estudio en contacto con la superficie externa de la piel. El compartimento receptor se llenó con buffer salino de fosfatos para simular el medio interno, manteniendo con agitación constante (180 rpm). Para la cuantificación del principio activo acumulado en éste compartimento se extrajeron muestras a intervalos predeterminados de tiempo. 0,01 mL de estas muestras se llevaron a 2,71 mL de volumen final y se analizaron por espectroscopia UV-Vis ($\lambda = 209,2\text{ nm}$), haciendo uso de una curva de calibración construida previamente con soluciones de concentraciones crecientes de enalapril (hasta $8,5 \times 10^{-5}\text{ M}$) en buffer salino de fosfatos pH 7,4. En el rango de las concentraciones de trabajo se observa cumplimiento de la Ley de Beer, siendo la absorptividad molar del fármaco $\varepsilon = 15.841,98\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El paso de sustancias a través de la piel se produce por difusión pasiva, fenómeno que puede ser interpretado aplicando las leyes de Fick (Levine, 2002; Yamashita y Hashida, 2003). El flujo J_m y el coeficiente de permeación K_p de fármacos, a través del estrato córneo en condiciones estacionarias, se puede calcular haciendo uso de las siguientes expresiones:

$$J_m = Q_m / (t \cdot A) \quad (1)$$

$$J_m = K_p \cdot \Delta C \quad (2)$$

donde, J_m es la cantidad de masa transferida por unidad de área y por unidad de tiempo ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); K_p es el coeficiente de permeación ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) y ΔC , gradiente de concentración de enalapril a través de la membrana, es aproximadamente igual a su concentración en el compartimento donador.

En la Tabla 1 se informan los resultados obtenidos para enalapril en gel de carbopol en ausencia y presencia de L-mentol. Los perfiles de permeación se obtuvieron mediante la representación gráfica de las cantidades acumuladas de enalapril por unidad de área (Q/A) en función del tiempo. El análisis de estos permite inferir que el pasaje del fármaco es totalmente substancial al comienzo llegando a una meseta (valor máximo de concentración $650 \mu\text{g}$, aproximadamente) en un corto período de tiempo.

Tabla 1: Valores experimentales de la permeación de enalapril a través de piel de cerdo
(t: tiempo en min; Q/A: cantidades acumuladas de enalapril por unidad de área en $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.)

t	Q/A para diferentes porcentajes de L-mentol						
	0%	1,20%	2,50%	3,25%	3,82%	4,03%	5,00%
0	0	0	0	0	0	0	0
5	223,1 ± 25,9	210,2 ± 22,9	249,3 ± 82,4	356,3 ± 10,2	375,9 ± 84,3	353,6 ± 87,0	254,6 ± 32,5
10	449,7 ± 45,7	462,6 ± 47,7	490,4 ± 90,8	478,7 ± 18,3	553,2 ± 54,0	564,8 ± 102	509,4 ± 50,6
15	555,6 ± 115	594,0 ± 83,9	501,0 ± 72,4	-	613,6 ± 16,1	610,0 ± 120	623,1 ± 32,6
20	660,6 ± 43,1	687,6 ± 124	584,9 ± 151	580,9 ± 51,0	720,4 ± 25,2	586,0 ± 186	742,5 ± 114
25	644,3 ± 44,7	-	626,2 ± 161	613,1 ± 99,7	605,4 ± 7,30	582,8 ± 113	849,0 ± 233
30	510,0 ± 44,9	798,4 ± 156	640,4 ± 117	608,1 ± 63,4	650,7 ± 43,8	541,4 ± 60,9	963,6 ± 358

En la Tabla 2 se presentan los valores de flujo (J_m) y coeficientes de permeación (K_p), calculados desde la pendiente de la zona lineal de los perfiles de permeación y aplicando la ecuación 2, respectivamente. Se observa que la adición de pequeñas cantidades de L-mentol provoca un incremento progresivo de los parámetros de permeación J_m y K_p , hasta alcanzar valores máximos para la formulación conteniendo 3,82% de promotor.

Tabla 2: Parámetros de permeación para las formulaciones de enalapril
(J_m : flujo en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; K_p : coeficiente de permeación en $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$.)

% L-mentol	$J_m \times 10^7$	$K_p \times 10^6$
0	7,49 ± 0,76	5,06 ± 0,51
1,20	7,71 ± 0,80	5,21 ± 0,54
2,50	8,17 ± 1,5	5,52 ± 1,0
3,25	8,33 ± 0,30	5,63 ± 0,23
3,82	9,52 ± 1,1	6,43 ± 0,74
4,03	9,41 ± 1,7	6,36 ± 1,1
5,00	8,48 ± 0,85	5,73 ± 0,57

La actividad de penetración de los aumentadores de la permeación puede ser expresada en términos de una relación de aumento:

$$RA = \frac{\text{coeficiente de permeabilidad con el uso de promotor}}{\text{coeficiente de permeabilidad en ausencia de promotor}} \quad (3)$$

La formulación de enalapril en gel de carbopol adicionada de 3,82% de L-mentol presentó un RA de 1,27 ($6,43 \times 10^{-6}/5,06 \times 10^{-6}$).

Fujii et al. (2003), en su estudio de permeación de antipirina utilizando L-mentol como promotor en formulaciones conteniendo 40 % de etanol, obtienen un aumento de once veces en los valores de flujo de permeado respecto del control. La aparente diferencia en el efecto del promotor L-mentol se debe a la presencia de la elevada concentración de etanol que provoca alta irritación de la piel, disminuyendo en forma desmedida su capacidad de barrera.

El efecto aumentador de L-mentol sobre la permeación de enalapril puede ser atribuido a la acción directa de éste sobre la estructura de la membrana, promoviendo su distensión por disrupción reversible de la barrera lipídica. Esto fue demostrado mediante estudios microscópicos de la piel de cerdo expuesta a L-mentol realizados previamente. Los mismos evidenciaron que, si bien se mantiene la integridad de la piel, se observa una mayor separación de las capas de células queratinizadas (Lhez et al., 2010).

El agregado de mayores concentraciones de L-mentol en la formulación de enalapril en gel de carbopol produjo una disminución del flujo de permeado. Este hecho podría atribuirse a una disminución de la actividad termodinámica del fármaco (Barry, 2004a). Por lo tanto, la proporción de L-mentol en las formulaciones estaría condicionada al compromiso entre una adecuada disrupción de la barrera lipídica de la piel y una óptima actividad termodinámica del principio activo.

CONCLUSIONES

De los estudios de permeación *ex vivo* de enalapril a través de piel de cerdo, en ausencia y presencia del promotor L-mentol, se puede concluir que:

1. En ausencia de promotor se observó difusión del principio activo al compartimento receptor.
2. La incorporación de L-mentol incrementó los flujos de permeado de enalapril, obteniéndose el máximo valor cuando la concentración de promotor en la formulación fue 3,82% p/p.
3. Si los datos obtenidos en este estudio se trasladaran a una administración *in vivo*, con la aplicación de la formulación en un área de 10 cm^2 se alcanzaría una concentración sistémica de $1,3 \mu\text{g/mL}$.

La concentración sistémica obtenida por la administración oral de enalapril oscila entre 0,6 y $2,6 \mu\text{g/mL}$, dependiendo de la dosis. Los parámetros fisicoquímicos, flujo y coeficiente de permeación, y la cantidad máxima acumulada obtenidos en el presente trabajo indican que la administración transdérmica permitiría alcanzar las concentraciones de enalapril necesarias para lograr el efecto farmacológico deseado, en un corto periodo de tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Luis y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina por el soporte financiero.

REFERENCIAS

- Amnuait, C.; Ikeuchi, I.; Ogawara, K.; Higaki, K.; Kimura, T. (2005); *Skin permeation of propranolol from polymeric film containing terpene enhancers for transdermal use*. International Journal of Pharmaceutics: 289(1-2), 167-178.
- Barry, B.W. (2004a); *Administración de fármacos por vía transdérmica*. In: Farmacia: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas (Aulton M.E. ed.) pp. 499-533, 2ª Ed., Elsevier España S.A., Madrid.
- Barry, B.W. (2004b); *Breaching the skin's barrier to drugs*. Nature Biotechnology: 22, 165-167.
- Benson, H.A.E. (2005); *Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques*. Current Drug Delivery: 2, 23-33.
- Cilurzo, F.; Minghetti, P.; Sinico, C. (2007); *Newborn Pig Skin as Model Membrane in In Vitro Drug Permeation Studies: A Technical Note*. AAPS Pharmaceutical Science and Technology: 8(4), Article 94.
- Fujii, M.; Takeda, Y.; Yoshida, M.; Utoguchi, N.; Matsumoto M.; Watanabe, Y. (2003); *Comparison of skin permeation enhancement by 3-l-menthoxypropane-1,2-diol and l-menthol: the permeation of indomethacin and antipyrine through Yucatan micropig skin and changes in infrared spectra and X-ray diffraction patterns of stratum corneum*. International Journal of Pharmaceutics: 258 (1-2), 217-223.
- Galiana, J.; Gil, M. (1997); *Fármacos Antihipertensores*. In: Farmacología humana. (Florez, J., Armijo, J.A. y Mediavilla, A. eds.) pp. 671-683, 3ª Ed. Mason S.A., Barcelona, España.
- Godin, B.; Touitou, E. (2007); *Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models*. Advanced Drug Delivery Reviews: 59(11), 1152-1161.
- Jain, A.K.; Thomas, N.S.; Panchagnula, R. (2002); *Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride: I. Effect of terpenes*. Journal of Controlled Release: 79, 93-101.
- Levine, I. (2002); Físicoquímica. 4th Ed., McGraw Hill Co, New York, USA, vol. 2, pp. 515-559.
- Lhez, L.; Allemandi, D.A.; Palma, S.D.; Pappano, N.B.; Debattista, N.B. (2010); *Transdermal delivery of probenecid: the effects of vehicles and enhancers on permeation through pig skin*. En prensa en Latin American Journal of Pharmacy: 29 (4), 602-606.
- Narishetty, S.T.; Panchagnula, R. (2004); *Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action*. Journal of Controlled Release: 95, 367-379.
- Olivella, M.S.; Lhez L.; Pappano N.B.; Debattista N.B. (2007); *Effects of dimethylformamide and L-menthol permeation enhancers on transdermal delivery of quercetin*. Pharmaceutycal Development and Technology: 12(5), 481-484.
- Pathan, I.B.; Setty, C.M. (2009); *Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery Systems*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research: 8(2), 174-179.
- Thong, H.Y.; Zhai, H.; Maibach, H.I. (2007); *Percutaneous Penetration Enhancers: An Overview*. Skin Pharmacology and Physiology: 20, 272-282.

Watanabe, H.; Obata, Y.; Ishida, K.; Takayama, K. (2009); *Effect of l-menthol on the thermotropic behavior of ceramide 2/cholesterol mixtures as a model for the intercellular lipids in stratum corneum*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces: 73, 116-121.

Williams, A.C.; Barry, B.W. (2004); *Penetration enhancers*. Advanced Drug Delivery Reviews: 56(5), 603-618.

Yamashita, F.; Hashida, M. (2003); *Mechanistic and empirical modeling of skin permeation of drugs*. Advanced Drug Delivery Reviews: 55(9), 1185-1199.

