

Preparación de un sistema anhidro de administración de micelas inversas para mejorar la administración oral. Biodisponibilidad y eficacia antidiabética de berberina

Para mejorar la biodisponibilidad oral y la eficacia antidiabética de la berberina (BER), se preparó un sistema de suministro de micela inversa anhidra (ARM) mediante liofilización de emulsiones de agua en aceite (W / O). Usando fosfatidilcolina de soja como emulsionante, se prepararon emulsiones W / O que contenían BER y luego se liofilizaron para formar productos secos que, tras la adición de aceite, formaron ARM transparentes que contenían nanopartículas de BER amorfas. Se administraron ARM cargados con BER o soluciones de BER libres a ratones diabéticos inducidos por estreptozocina. Las mediciones in vivo demostraron que los niveles de glucosa en sangre (BGL) de ratones diabéticos se redujeron en promedio al 22% de los valores iniciales 4 h después de la inyección intravenosa de solución de BER a la dosis de 2.5 mg / kg de peso corporal, mientras que la reducción promedio de BGL fue 57% en el grupo con ARM a la dosis de 100 mg / kg de peso corporal. No se observó una reducción significativa de BGL en ratones que recibieron soluciones de BER por vía oral. **En comparación con las soluciones de BER, la biodisponibilidad oral de las ARM cargadas con BER mejoró 2,4 veces, y la concentración máxima de BER en la sangre se mejoró 2,1 veces con un retraso de 2 h que condujo a una eficacia prolongada.** Por lo tanto, este novedoso sistema de administración ARM proporciona un método válido para mejorar la capacidad de biodisponibilidad oral y la eficacia antidiabética de la BER, ofreciendo una alternativa de producto prometedora a otros medicamentos hipoglucémicos para el tratamiento de la diabetes.

Berberina es una sal de amonio cuaternario del grupo de alcaloides de isoquinolina. Se encuentra en plantas como *Coptis chinensis*, sello de oro (*Hydrastis canadensis*) y *Berberis*, generalmente en las raíces, rizomas y cortezas. Las hierbas que contienen abundantemente BER tienen una larga historia tradicional que se usa en la medicina popular china, ayurvédica y del Medio Oriente principalmente por sus propiedades antimicrobianas y antiprotozoarias (Imanshahidi y Hosseinzadeh, 2008). Además, estas hierbas ricas en BER se han utilizado en la medicina tradicional china para el tratamiento de muchas otras dolencias o enfermedades crónicas, como tumores, depresión, hipertensión, hipercolesterolemia, manía y diabetes mellitus, como se registra en una variedad de medicamentos antiguos. Obras medicinales clásicas chinas (Chen y Lin, 2006). Por ejemplo, el médico de la dinastía Tang (hace 1300 años), Simiao Sun, prescribió en su famoso trabajo *Thousand Golden Prescripciones* 9 formulaciones que contienen *Coptis chinensis* como el componente principal para el tratamiento de XiaoKeZheng (síndrome de sed), a saber, diabetes mellitus. (Sun, 2008), que es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por altos niveles de azúcar en la sangre, ya sea porque el cuerpo no produce suficiente insulina (diabetes tipo 1) o porque las células no responden a la insulina (diabetes tipo 2). La diabetes ha afectado desde hace mucho tiempo a los seres humanos y ahora sigue siendo una enfermedad refractaria (Li et al., 2004). Hoy en día la investigación sobre BER ha revelado varias propiedades farmacológicas y usos medicinales, sugiriendo que BER es uno de los principales ingredientes activos en el tratamiento de diversas patologías.

Recientemente, muchos grupos de investigación han demostrado un fuerte impacto de la BER en la homeostasis de la glucosa y sus marcados efectos antidiabéticos tanto en los seres humanos como en los modelos de roedores, especialmente, con diabetes tipo 2 (Wang et al., 2011; Yin et al., 2008a; Zhang et al., 2008). El mecanismo de acción del efecto antidiabético de BER ha sido ampliamente investigado (Yin et al., 2008b).

La actividad antidiabética de BER está relacionada con la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), el inicio agudo de la actividad de transporte de glucosa del transportador de glucosa GLUT1 y la mejora de la transducción de señales de insulina en miotubos resistentes a la insulina en células cultivadas (Cok et al., en prensa; Liu et al., 2010; Yin et al., 2008a). Además, investigaciones recientes demostraron que BER es capaz de modular de manera diferencial las actividades de ERK, p38 MAPK y JNK para suprimir la diferenciación de células T Th17 y Th1 para recuperar la destrucción de células B mediada por células T en ratones diabéticos tipo 1 (Cui et al., 2009). Ahora, la propiedad antidiabética de BER atrae cada vez más intereses de investigación porque los productos naturales seguros y convenientes de usar son más bien deseados que algunos medicamentos disponibles actualmente con problemas de efectos adversos y resistencia a los medicamentos (Li et al., 2004). Sin embargo, los efectos antidiabéticos de la BER se han informado solo en estudios a largo plazo que respaldan sus capacidades insulínótropas y de sensibilización a la insulina (Zhang et al., 2008). Además, hasta ahora solo las formas de dosificación convencionales, como soluciones y tabletas, se han utilizado para realizar los experimentos y ensayos para probar los efectos de hipoglucemia de BER en sujetos hiperglucémicos (Cui et al., 2009; Der-osa et al., 2009; Zhang et al., 2008). BER generalmente está disponible comercialmente como dihidrato de cloruro de berberina, que es ligeramente soluble en agua. En lo que respecta al uso de BER para la terapia antidiabética, las formas de dosificación convencionales no son eficientes para la administración oral, porque la absorción intestinal de BER ha resultado muy pobre debido a su limitada permeabilidad de membrana y la biodisponibilidad es generalmente menos del 5% (Cicero y Ertek, 2009; Zuo et al., 2006). Esto puede explicar por qué los estudios anteriores sobre BER se centraron en el tratamiento a largo plazo, que generalmente lleva varias semanas o incluso meses (Zhang et al., 2008); y esto también puede explicar por qué los efectos antidiabéticos del fármaco observados fueron, a veces, no tan potentes como se esperaba (Li et al., 2004; Zhang et al., 2008). Por estas razones, existe controversia sobre la propiedad antidiabética de BER (Zuo et al., 2006). Obviamente, un sistema eficiente de administración de medicamentos que pueda mejorar efectivamente la biodisponibilidad oral de BER será beneficioso para confirmar sus efectos antidiabéticos y la terapia relacionada.

En informes anteriores, se utilizaron nuevos procedimientos basados en la liofilización de emulsiones para preparar liposomas cargados de fármacos y una formulación aceitosa basada en fosfolípidos y glicéridos (Wang et al., 2009a, b, 2006, 2010). La formulación aceitosa contenía micelas inversas especiales y se había utilizado como transportador de ácido clorhídrico, insulina, para administración oral (Wang et al., 2010). A diferencia de las micelas inversas convencionales que tienen una fase de agua interna independiente (Chen et al., 2008; Walde et al., 1990), la nueva formulación oleosa atrapó solo agentes hidrófilos secos en nano-núcleos que rodean fosfolípidos y, por lo tanto, se describió como un sistema de administración de fármacos de micela inversa anhidra (ARM) (Wang et al., 2010). Confirmó que los ARM podrían proteger eficazmente el péptido hidrofílico del daño en condiciones gastrointestinales severas y podrían mejorar enormemente la eficacia antidiabética de la insulina (Wang et al., 2010). Los ARM son un atractivo sistema de administración de medicamentos orales por varias razones. Son componentes dietéticos normales y tienen propiedades de barrera que pueden proteger contra el daño del agua y otros componentes intestinales, como las enzimas proteolíticas y los protones, y también tienen propiedades para mejorar la penetración (Fricker et al., 2010; New y Kirby, 1997; Pouton y Charman, 1997). Además, las fases oleosas pueden formar un continuo con otras barreras lipídicas en el cuerpo, por ejemplo, los lípidos de la piel y las membranas celulares, y de esta manera podrían permitir el paso de componentes disueltos que de otro modo estarían excluidos (Kirby, 2000; Torchilin, 2007).

En este informe, se implementó el procedimiento simple FWE (lío-filización de emulsiones de agua en aceite) para preparar a base de fosfolípidos ARM atrapados en BER con el propósito de mejorar la capacidad de biodisponibilidad oral del fármaco y verificar su eficacia antidiabética. La metodología de preparación de ARM incluye la preparación de emulsiones de agua en aceite (W / O) submicrométricas que contienen fosfolípidos como emulsionantes en fase oleosa y BER hidrófila en agua, liofilización para eliminar solventes y adición de aceite de glicéridos para formar ARM. Los ARM cargados con BER se administraron por vía oral a ratones diabéticos tipo 1 inducidos por estreptozocina (STZ) para investigar los efectos hipoglucémicos in vivo, biodisponibilidad oral, farmacocinética y eficacia antidiabética del fármaco.

Materiales y métodos.

Materiales.

La fosfatidilcolina de soja (SPC, Lipoid S 100, pureza > 94%) se adquirió de Lipoid (Ludwigshafen, Alemania). El triglicérido de cadena media (MCT, C8 56.5%, C10 43%) fue proporcionado por Green-well Oleochemicals Co., Ltd. (Shah Alam, Malasia). El clorhidrato de berberina (BER, pureza > 98%) se obtuvo de Xieli Pharma-ceutical Co., Ltd. (Pengzhou, provincia de Sichuan, China). La estreptozocina (STZ) fue un producto de Sigma-Aldrich (Shanghai, China). Los solventes utilizados para las fases móviles cromatográficas fueron de grado HPLC. El agua bidestilada fue preparada por uno mismo. Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico reactivo.

Preparación de ARM mediante liofilización de emulsiones W / O (FWE)

Las ARM que contienen BER se prepararon de acuerdo con un método anterior con poca modificación (Wang et al., 2010). Se usó una mezcla de ciclohexano / diclorometano / éter dietílico (4: 1: 1, v / v / v) que contenía SPC como fase oleosa externa (O). BER se disolvió en agua para dar una concentración inicial de fármaco de 2 mg / ml y se usó como la fase acuosa interna (W). Se investigaron diferentes proporciones de masa de SPC a BER (de 5: 1 a 50: 1) para determinar la cantidad mínima de SPC necesaria para solubilizar el fármaco, es decir, para formar un sistema ARM. Para formar emulsiones submicrométricas de W / O, se añadió una mezcla de W y O (1: 4, v / v) a una ampolla (a gran escala se puede usar un recipiente apropiado). Y luego, usando un baño de hielo / agua para mantener la temperatura por debajo de los 25 ° C, la mezcla se sonicó con un sonicador de tipo sonda (JY92-II, Scientz Biotechnology Co., Ltd., Ningbo, China) en modo de pulso (pulso encendido, 3 s; pulso apagado, 5 s; 80 W). Luego, las emulsiones de W / O submicrométricas uniformemente opalescentes se transfirieron inmediatamente a viales de liofilización de 5 ml con un volumen de llenado de 2 ml, y se congelaron rápidamente a 80 ° C en un congelador de temperatura ultrabaja (MDF-U73V, Sanyo Electric Co., Ltd., Japón). Después de congelarse a 80 C durante 4 h, las muestras de emulsión se liofilizaron en un liofilizador (Eyela FDU-1100 / DRC-1000, Tokio Rikaki-kai, Japón) utilizando el siguiente procedimiento: secado primario a 37, 30, 20 C por períodos de 4, 2 y 2 h, respectivamente; y secado secundario a 20 ° C durante 4 h. La presión de la cámara se mantuvo por debajo de 10 Pa durante el proceso de secado. Cuando se completó el proceso de liofilización, los viales se llenaron inmediatamente con gas nitrógeno, se sellaron y se almacenaron protegidos de la luz a 4 ° C. Cuando se añadió una cantidad apropiada (no menos de la mitad del volumen inicial de emulsiones W / O, es decir, 1 ml en este caso) de aceite MCT en el vial de liofilatos, se obtuvieron ARM cargadas con BER.

ARM formación y análisis.

El contenido de agua de los productos FWE se analizó utilizando un analizador de trazas de humedad (KLS-411, Leici Precision & Scientific Instrument Co., Ltd., Shanghai, China). Las condiciones de formación de ARM se analizaron midiendo la absorbancia óptica (OA) a 660 nm de las formulaciones oleosas (Hammad y Muller, 1998), utilizando un espectrofotómetro UV-vis de doble haz (TU-1901, Purkinje General Instrument Co., Ltd., Bei-jing, China), y el aceite MCT sirvieron como control en blanco. Luego, los datos se trazan con OA versus relación de masa de SPC a fármaco. El OA de cero indica la solubilización completa de los fármacos hidrofílicos en aceite, es decir, la formación de un sistema ARM. El punto de inflexión correspondiente al aumento repentino del valor de OA se consideró como el valor mínimo de la relación de masa SPC / fármaco requerida para formar ARM (Hammad y Muller, 1998).

Para determinar la cantidad y recuperación de BBR en formulaciones oleosas, se mezclaron homogéneamente 0,1 ml de una formulación oleosa y Triton-X100 al 10% y 9,8 ml de agua, y luego la mezcla se analizó por HPLC (líquido LC-6AD cromatógrafo, detector UV SPD-20A, automuestreador SIL-10AF, Shimadzu, Japón), utilizando una columna ODS (4,6 mm \times 250 mm, diámetro de partícula de 5 μ m, Hanbon S&T Co., Ltd., Huaian, Jiangsu, China). La fase móvil fue agua (0.2% de trietilamina, pH 3.0 por ácido fosfórico) –metanol (75:25, v / v), filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45 μ m y desgasificada por sonicación antes de su uso. La velocidad de flujo fue de 1,0 ml / min. El volumen de inyección fue de 20 μ l. La detección se realizó a una longitud de onda de 347 nm a temperatura ambiente (Kheir et al., 2010).

Dispersión dinámica de luz (DLS)

DLS analizó el tamaño de la gotita de agua interna en las emulsiones iniciales de W / O y el tamaño de las partículas en los ARM utilizando un Malvern Zetasizer NS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Se utilizaron cubetas de cuarzo para las pruebas de DLS y la luz de dispersión se recoge en un ángulo de 90. La prueba DLS se realizó a 20 ° C. Para la determinación del tamaño de la emulsión, el disolvente en blanco era una mezcla de ciclohexano / diclorometano / éter dietílico (4: 1: 1, v / v / v) con una viscosidad de 0,83 cP y un índice de refracción de 1,37 a 20 ° C; y para los ARM, el disolvente en blanco era aceite MCT con una viscosidad de 29,7 cP y un índice de refracción de 1,45 a 20 ° C. La dispersión del solvente en blanco se restó de la dispersión total de la muestra para determinar la relación de Rayleigh excedida, a partir de la cual se determinó el tamaño de partícula / gota. Para cada muestra, la concentración del fármaco se fijó a 0.1 mg / ml, y las mediciones de DLS se repiten tres veces. Los valores ganados para los ARM son los diámetros "hidrodinámicos" de las micelas.

Caracterización de los liofilatos FWE

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras de los liofilatos FWE se fijaron en un trozo SEM con cinta conductora de doble cara, se recubrieron al vacío con una capa delgada de oro / paladio y se examinaron usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Superscan SSX-550, Shimadzu, Ja -pan) equipado con un sistema de control informático digital completo. Se usó un voltaje de aceleración de 15 kV.

Análisis térmico.

El análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizó utilizando el calorímetro diferencial de barrido serie DSC-60 (Shimadzu DSC 60, Japón). Aproximadamente 5 mg de BER o 15 mg de los polvos liofilizados se pesaron con precisión en una bandeja de aluminio y se sellaron para su análisis. Se empleó una velocidad de calentamiento de 10 C / min en el rango de temperatura de 30-250 C. Se usó una sartén vacía como referencia.

Ensayo de liberación de fármaco in vitro.

Se usó un método de ultrafiltración para el ensayo de liberación del fármaco (Wang et al., 2010). Brevemente, se mezclaron 0,5 ml de formulaciones a base de aceite con 9,5 ml de un tampón ácido (HCl 0,01 M, NaCl 0,021 M, pH 2.5) o un tampón neutro (NaH₂PO₄ 0.06 M, pH 6.8). Luego, la mezcla se transfirió a una celda de ultrafiltración agitada de 10 ml (Ami-con 8010, Millipore Corporation, Bedford, EE. UU.) Con una membrana de corte de 10,000 Da, agitando a cierta velocidad (120 o 60 rpm) a 37 ° C. Luego, en puntos de tiempo predeterminados, se separó una alícuota de solución acuosa (0,5 ml) de la mezcla ARM-tampón mediante ultrafiltración impulsada por presión de gas nitrógeno, y se añadió inmediatamente un volumen igual de medio fresco después de cada ultrafiltración. Luego, la cantidad del fármaco liberado del aceite en el medio en diferentes puntos de tiempo podría calcularse mediante el ensayo de los ultrafiltrados utilizando el método HPLC mencionado anteriormente.

Experimentos en vivo.

Los animales empleados para probar diferentes formulaciones que contienen BER fueron ratones Kunming machos (20 ± 2 g) proporcionados por el Experimental Animal House of Jining Medical College (JMC). Todos los protocolos de experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales de la Sección de Farmacia de JMC y se llevaron a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Clark et al. , 1996).

Modelos diabéticos tipo 1 inducidos por estreptozocina (STZ) en ratones.

Los ratones se volvieron diabéticos mediante una inyección intraperitoneal una vez al día de STZ (disuelto en tampón de citrato 10 mM a pH 4,5) a una dosis de 40 mg / kg de peso corporal durante 5 días (Wu y Huan, 2008). Los ratones se consideraron diabéticos cuando su BGL en ayunas era superior a 8 mM, 2 semanas después del tratamiento con STZ.

Efectos hipoglucemiantes de una vez la administración de formulaciones de BER.

Se emplearon cuatro grupos de ratones diabéticos tipo 1 y cada grupo contenía 18 ratones. Todos los ratones estaban en ayunas durante la noche antes y durante el experimento, pero tenían libre acceso al agua. El primer grupo de ratones se calibró con ARM cargados con BER a una dosis de 100 mg / kg de peso corporal. El segundo grupo se inyectó a través de la vena de la cola una solución de agua BER que había sido esterilizada por filtración a través de membranas microporosas de 0,22 μ m, a una dosis de 2,5 mg / kg de peso corporal. Al tercer grupo se le administró intragástricamente una solución de agua BER a una dosis de 100 mg / kg de peso corporal; y, del mismo modo, el cuarto con la misma cantidad de aceite MCT que contiene SPC, y se utiliza como control. Para la prueba de nivel de glucosa en sangre (BGL), se recogieron muestras de sangre de las venas de la cola de los ratones antes de la administración del fármaco y a diferentes intervalos de tiempo después de la dosificación. Los BGL se determinaron inmediatamente utilizando un medidor de glucosa en sangre SureStep Plus y tiras reactivas One Touch (Johnson & Johnson).

Con un rango de prueba de 1.1–33.3 mM y un límite de detección de 0.1 mM . Después de cada prueba de BGL después de la dosificación, los ratones se anestesiaron inmediatamente por inhalación de éter y luego se tomaron muestras de sangre para determinar la biodisponibilidad del fármaco y el estudio farmacocinético.

Estudio de biodisponibilidad y farmacocinética de fármacos.

Para evaluar la biodisponibilidad y la farmacocinética de las formulaciones de BER, se usaron los cuatro grupos de ratones anteriores, pero el grupo iv y cada grupo de sonda incluyeron 6 y 3 ratones más, respectivamente, y sus muestras de sangre se recogieron de las cavidades cardíacas después de la anestesia. Debido al volumen sanguíneo limitado, en cada punto de tiempo se usaron tres ratones y luego se sacrificaron inmediatamente después del muestreo. Por lo tanto, el grupo iv contenía 24 ratones y cada grupo oral contenía 21 ratones. Cada muestra de sangre recolectada se transfirió inmediatamente a un tubo de centrifuga heparinizada de 1,5 ml y se centrifugó a 23,000 g durante 15 minutos. Luego se transfirió una parte alícuota de 0,2 ml del sobrenadante a un tubo de centrifuga de 1,5 ml y se mezcló con 0,8 ml de metanol por vórtice durante 1 min. El precipitado de proteína desnaturizado resultante se separó por centrifugación a 23,000 g durante 15 min. Luego se colocó una alícuota de 0,5 ml del sobrenadante en un tubo de centrifuga de 1,5 ml. Se dejaron evaporar a 37 ° C y luego el residuo se disolvió en 0,5 ml de metanol. El sobrenadante se separó por otra centrifugación a 23.000 g durante 15 minutos y luego se transfirió a una botella de vidrio de muestra de 1 ml y se selló. Se inyectó un volumen de 20 l de cada solución de muestra con el inyector automático en el sistema de HPLC para el análisis de BER utilizando el método de HPLC descrito anteriormente que se ha demostrado válido en la cuantificación de BER in vivo en ratones (Kheir et al., 2010) Además, la linealidad, precisión, recuperación de BER en plasma de ratón y los límites de cuantificación y detección con el método HPLC se evaluaron de acuerdo con la referencia (Kheir et al., 2010). Los datos de estas muestras se utilizaron para evaluar la biodisponibilidad de las formulaciones de BER y para construir perfiles farmacocinéticos mediante el trazado de la concentración del fármaco frente al tiempo. Las curvas de concentración de plasma BER-tiempo después de la administración se evaluaron utilizando el software SPSS Versión 13. La concentración sanguínea máxima (C_{máx}) y el tiempo de concentración sanguínea máxima (t_{máx}) se obtuvieron directamente por observación a partir de las curvas de concentración plasmática del fármaco-tiempo.

Los datos del grupo iv se usaron para evaluar el modelo del compartimento farmacocinético. Un gráfico a escala logarítmica de la curva de disminución del nivel de sangre de un modelo de 1 compartimento produce una línea recta, mientras que un gráfico a escala logarítmica de la curva de disminución del nivel de sangre de un modelo de 2 compartimentos produce una línea bifásica (Shargel et al., 2004) .

El AUC (0-16) fue el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde el tiempo 0 h hasta el punto final de tiempo de concentración probado 16 h después de la administración oral y se calculó utilizando la regla trapezoidal lineal. El AUC (0-∞) fue el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde el tiempo 0 h hasta el infinito después de la administración oral y se calculó utilizando los parámetros obtenidos de los perfiles farmacocinéticos construidos. El cálculo para parámetros que incluyen otros como t_{1/2ka} (semivida de absorción del fármaco), t_{1/2a} (semivida de distribución del fármaco, para el modelo de 2 compartimentos), t_{1/2b} (semivida del fármaco claro -ance, para el modelo de 2 compartimentos) y k_{cl}, se realizó de acuerdo con la referencia (Shargel et al, 2004).

La biodisponibilidad (BA) y la biodisponibilidad relativa (RBA) de las formulaciones de BER de prueba después de la administración oral se calcularon utilizando las siguientes fórmulas.

Eficacia antidiabética de la administración a largo plazo de ARM cargados con BER

Se emplearon dos grupos de ratones diabéticos tipo 1 y cada uno contenía cinco ratones. Antes de la administración del fármaco, se analizaron los BGL de todos los ratones después de ayunar durante la noche. Luego, el primer grupo de ratones se calibró una vez al día con ARM cargados con BER a una dosis de 100 mg / kg de peso corporal durante 7 días. Al segundo grupo se le administró oralmente la misma cantidad de aceite MCT que contenía SPC, y se usó como control. Para cada administración de fármaco, excepto la última vez, los ratones fueron en ayunas continuamente durante 8 h, es decir, 4 h antes y 4 h después de la dosificación. En el séptimo día, después de estar en ayunas durante la noche, los ratones fueron calibrados con ARM. Además, los BGL de los ratones se probaron antes de la administración del fármaco y a diferentes intervalos de tiempo después de la dosificación utilizando el método mencionado anteriormente. Se suministró agua a los ratones todo el tiempo.

Análisis estadístico.

Los datos se presentan como media \pm DE (desviación estándar). Para la comparación grupal, se aplicó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Las diferencias significativas en los valores medios se evaluaron mediante una prueba t de Student. Los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Se utilizó el software SPSS Versión 13 para el análisis de datos.

RESULTADOS

Tamaño de gota de las emulsiones W / O.

El examen DLS indicó que el tamaño de la gota de agua interna de las emulsiones W / O era inferior a 500 nm con un diámetro medio (MD) de 330 ± 280 nm (MD \pm SD, n = 3).

Condición de formación de ARM.

El contenido de agua en las formulaciones oleosas o liofiladas de FWE fue inferior al 0,5% (p / p). Por lo tanto, las moléculas de agua no podrían agregarse como una microfase acuosa independiente para formar micelas inversas convencionales, que solo pueden formarse con una relación molecular de agua a SPC superior a 8 (Walde et al., 1990). El valor mínimo de la relación de masa SPC a BER necesaria para formar un sistema ARM fue de 25: 1, como se muestra en la figura 2.

El análisis por HPLC demostró que las recuperaciones del fármaco modelo BER por triplicado de los ARM de SPC / BER (10: 1) fueron 97.7%, 95.5% y 95.9%.

Tamaño de las partículas de ARM.

El examen DLS de las formulaciones oleosas con cero OA reveló que el tamaño de partícula de los ARM estaba por debajo de 60 nm. El diámetro medio (MD) de los ARM que contienen BER fue de 36 ± 21 nm (MD \pm SD, n = 3).

SEM

En la figura 3 se muestra una imagen SEM representativa de los liofilatos de FWE que contienen BER. Está claro que en los liofilatos de FWE había numerosas partículas con un MD de 28 nm.

DSC

Los termogramas DSC de BER y los liofilatos FWE que contienen BER se muestran en la Fig. 4. Se puede ver que, a diferencia de las materias primas de BER, los liofilatos FWE no demostraron ningún efecto agudo picos de transición endotérmica a 116 y 193 C de BER cristalino. Esto indica que la BER en los liofilatos FWE estaba principalmente en un estado amorfo.

Liberación de fármaco in vitro.

Los resultados de la liberación de BER de la formulación ARM bajo condiciones ácidas y neutras se muestran en la Fig. 5. Está claro que el pH del medio tuvo poco efecto sobre la liberación de BER, pero la agitación rápida aumentó notablemente la velocidad de liberación del fármaco. Tanto en medio ácido como neutro, agitado a 60 rpm, aproximadamente el 50% del BER total se volvió a alquilar de la formulación de ARM en 4 h. Pero cuando la agitación fue de 120 rpm, se liberó el 70% de BER en 4 h.

Eficacia antidiabética de las formulaciones de BER.

Se evaluaron los posibles efectos antidiabéticos de diferentes formulaciones de BER en ratones diabéticos tipo 1. La figura 6 ilustra los cambios en los niveles de glucosa en plasma de los ratones diabéticos después de un tratamiento con productos BER. Se observaron diferencias significativas en la reducción de la glucosa plasmática (porcentaje relativo al valor inicial) entre los grupos de control, solución de agua BER y ARM que contienen BER después de la administración del fármaco ($p < 0.05$). La inyección intravenosa de solución de BER a una dosis de 2.5 mg / kg de peso corporal y la administración oral de ARM atrapados en BER a 100 mg / kg redujeron en las primeras 4 h los BGL de los ratones diabéticos en ayunas al 22% y 57% de los valores iniciales, respectivamente. Especialmente en el grupo ARM cargado con BER, la reducción de glucosa continuó durante 12 h y volvió al 87% después de 16 h. Por el contrario, no hubo una reducción significativa de BGL en el grupo que recibió solución de agua BER, pero en el grupo MCT / SPC, los BGL no se redujeron, sino que aumentaron ligeramente al 107% en las primeras 4 h y luego volvieron al 105% y continuó hasta las 16 h.

En el grupo de administración de fármacos a largo plazo (período de 6 días), notablemente, los BGL de los ratones diabéticos tipo 1 volvieron al rango normal (3–7 mmol / L) después de la alimentación una vez al día con ARM atrapados con BER para 6 días seguidos. Curiosamente, la administración adicional de fármacos en el séptimo día no indujo una mayor reducción de BGL en los modelos de ratón, como se muestra en la Fig. 7. Esto podría sugerir que los ratones diabéticos tipo 1 inducidos por STZ pueden recuperarse de la enfermedad después de la administración oral de ARM atrapados en BER y BER no puede reducir los BGL de ratones normales.

Biodisponibilidad y farmacocinética del fármaco.

El método de HPLC fue válido para la cuantificación de BER en sangre de ratón. La ecuación de la curva de calibración construida para el plasma sanguíneo de los ratones fue $y = 531.6x + 2019.7$ (en el rango de 0.02 a 5.0 lg / ml), donde x es la concentración de BER en la sangre e y es el área bajo la curva. El coeficiente de correlación (R^2) fue de 0.996. Los valores de recuperación de 0.02, 0.5 y 5 lg / ml del plasma sanguíneo fueron 78.6%, 81.3% y 80.4%, respectivamente. Los coeficientes de variación para la precisión intra e interdiaria fueron inferiores al 10%, y el límite de cuantificación fue de 0,02 lg / ml, y el límite de detección fue de 0,0054 lg / ml.

En las Figs. Se muestran los perfiles de concentración de BER en plasma correspondientes en el tiempo y un gráfico de escala logarítmica de la curva de disminución del nivel de sangre del grupo iv. 8 y 9, respectivamente. La figura 9 muestra claramente que un gráfico de escala logarítmica de la curva de disminución del nivel de sangre del grupo iv produce una línea bifásica (fase lineal a y fase lineal lineal) que presenta un modelo de 2 compartimentos. Además, como se muestra en la Fig. 8, en todas las formulaciones, BER no se equilibra rápidamente en todo el cuerpo, como se supone para un modelo de un compartimento, sino que sigue la farmacocinética de un modelo de dos compartimentos: el fármaco se distribuye en dos compartimentos, el compartimento central y el tejido (compartimento periférico). Los parámetros farmacocinéticos relacionados se muestran en la Tabla 1. El grupo alimentado con la solución de BER de forma libre dio como resultado una concentración plasmática máxima a las 2 h después de la administración, mientras que la administración oral de ARM cargados con BER mostró una concentración plasmática máxima a las 4 h. El AUC (0-16 h) para el grupo tratado oralmente con ARM cargados con BER fue de 6 lg h / L, lo que corresponde a un aumento de BA de 2,4 veces. Estos resultados demostraron que la absorción intestinal de BER fue significativamente mejorada por los ARM, lo que aumentó notablemente su biodisponibilidad. Considerando que no se observó una reducción significativa de BGL en los ratones calibrados con solución de agua del fármaco, se puede concluir que BER tiene actividad antidiabética oral solo por el hecho de que el fármaco se administra en un sistema de administración eficiente, como ARM, para ser absorbido lo suficiente.

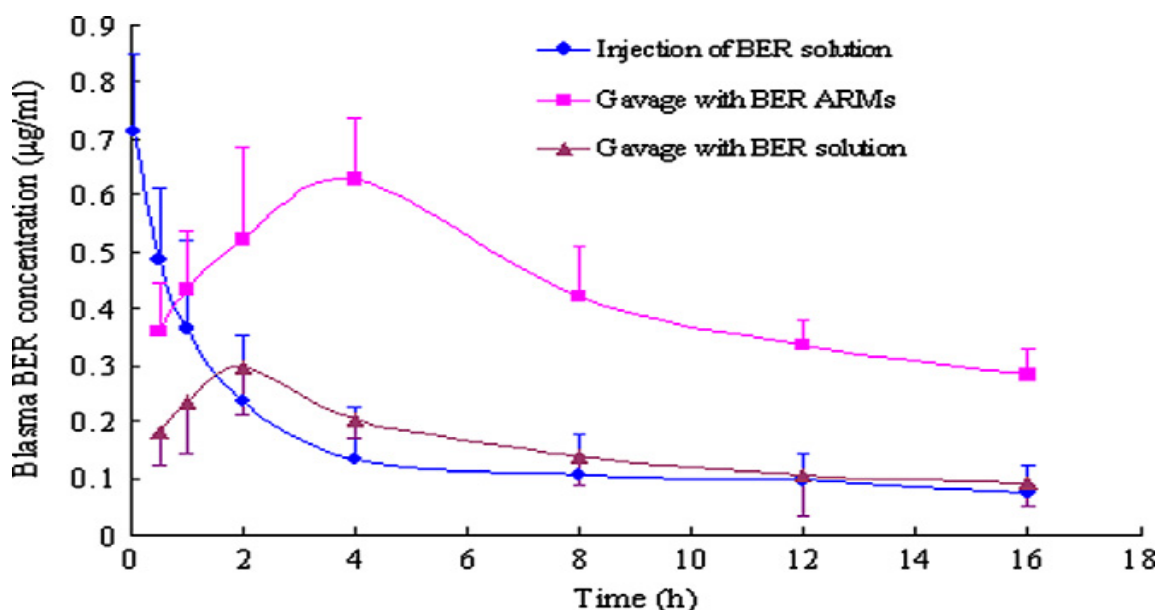


Fig. 8. El curso temporal de las concentraciones sanguíneas de BER después de la administración de diferentes formulaciones de BER a través de diferentes rutas. La dosis de BER para inyección fue de 2.5 mg / kg de peso corporal, la dosis de BER para sonda fue de 100 mg / kg de peso corporal y la dosis de BER cargada en ARM fue de 100 mg/kg de peso corporal. Cada punto y barra representa la media \pm DE (n = 3).

Tabla 1

Parámetros farmacocinéticos de BER en ratones diabéticos después de la inyección intravenosa de la solución de BER o la administración oral de ARM cargados de BER o solución de BER (n = 3)

Parameter	BER solution (iv)	BER ARMs (oral)	BER solution (oral)
Dose (mg/kg)	2.5	100.0	100.0
Cmax (lg/mL)	0.712	0.628	0.298
tmax (h)	0.083	4.0	2.0
t1/2a (h)	0.75	1.47	2.15
t1/2b (h)	35	16.18	23.15
kcl (h-1)	0.174	0.061	0.032
t1/2ka (h)	–	1.11	2.04
AUC(0–16) (lg h/L)	2.3	6.01	2.49
AUC(0–1) (lg h/L)	4.1	12.71	4.64
BA (%)	–	12.69	5.27
RBA (%)	–	241.0	100

Cmax: concentración plasmática máxima; tmax: tiempo en el que se alcanza la Cmax; t1 / 2a: vida media de la distribución del fármaco; t1 / 2b: semivida de eliminación del fármaco; kcl: la tasa real de despacho de drogas; t1 / 2ka: vida media de absorción del fármaco; **AUC (0–16)**: área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde el tiempo 0 h hasta el punto de prueba final 16 h después de la administración oral; **AUC (0-1)**: área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde el tiempo 0 h hasta el infinito después de la administración oral; **BA**: biodisponibilidad; **RBA**: biodisponibilidad relativa.

Discusión.

Los datos anteriores han demostrado claramente que BER tiene una potente eficacia antidiabética y puede solubilizarse en formulaciones oleosas para formar un sistema ARM que tiene la capacidad de mejorar la biodisponibilidad oral del fármaco y, por lo tanto, su eficacia antidiabética en la diabetes tipo 1. Aunque numerosas investigaciones clínicas centraron la terapia de BER en pacientes con diabetes tipo 2, que son los casos más comunes, los resultados de nuestra investigación indican que la BER administrada en ARM puede disminuir el BGL en ratones diabéticos tipo 1. Se informa que BER aumenta la absorción de glucosa a través de un mecanismo distinto de la insulina al estimular la absorción de glucosa mediada por GLUT1 al activar GLUT1 a través de la vía AMPK (Cok et al., En prensa; Kim et al., 2007; Zhou et al. , 2007). Esto sugiere que BER ejercerá su eficacia antidiabética tanto en presencia de insulina (diabetes tipo 2) como en ausencia de insulina (diabetes tipo 1). Además, los efectos antidiabéticos de BER en ratones diabéticos tipo 1 también habían sido observados por otros investigadores, y se exploraron los posibles mecanismos (Cui et al., 2009).

El mecanismo de formación de ARM se ha propuesto en un informe anterior en el que se usó insulina como fármaco modelo (Wang et al., 2010). En esta investigación, utilizando el procedimiento FWE, BER se cargó en ARM donde estaba rodeado por SPC y existía principalmente en forma amorfa, como lo confirmó el patrón DSC.

Se cree que los factores de decisión para el estado del fármaco en los ARM están relacionados con la formulación, el protocolo de congelación y las propiedades del fármaco. Por ejemplo, en el informe anterior, la materia prima de insulina contenía una cantidad trivial de iones de zinc que facilitaba la cristalización de la insulina durante el proceso de FWE (Wang et al., 2010). Se ha informado que el sobre enfriamiento y la congelación rápida inhiben la cristalización (Craig et al., 1999) y deberían ser responsables del estado amorfo de BER, que también fue indirectamente respaldado por el hecho de que la liberación de BER de ARM en medio acuoso fue mucho más rápida que la cristalina. insulina. Se sabe que el estado amorfo favorece la disolución del fármaco (Yu, 2001). Por otro lado, la BER amorfa en los ARM resultó en nanopartículas inestables grandes y sueltas que también facilitan la liberación del fármaco. Sin embargo, la división lenta de BER entre el núcleo hidrofílico y la fase oleosa externa, para la cual tiene una afinidad limitada, hace que el escape de drogas de los ARM sea difícil. Y la liberación principal del fármaco de las formulaciones oleosas se produjo solo cuando BER está en contacto con el medio acuoso, que de hecho está separado del fármaco por dos barreras: membranas SPC y aceite a granel. Por lo tanto, la liberación del fármaco se inhibe enormemente. Notablemente, la velocidad de liberación de BER tanto en medio ácido como neutro fue notablemente influenciada por agitación mecánica. Este no es el caso en los ARM de insulina (Wang et al., 2010). Tal vez la agitación vigorosa rompe las pequeñas gotas de aceite y las membranas de SPC que rodean aflojan las nanopartículas de BER que conducen a una liberación más rápida del medicamento. En la Fig. 10 se muestra un diagrama esquemático de la liberación de BER de los ARM. Cabe señalar que, en el intestino delgado, la tasa de liberación del fármaco de los ARM puede aumentar significativamente, porque la fase de aceite se emulsionará con sales biliares y El vehículo oleoso puede ser degradado por enzimas digestivas (Jones et al., 2008). Además, un aumento en el área específica interfacial puede actuar como otra fuerza impulsora para la liberación de drogas encapsuladas (Jones et al., 2008). A pesar de estos factores influyentes, las ARM que contienen BER proporcionan un efecto terapéutico prolongado, como lo confirman las pruebas in vivo.

Aunque BER es considerado como uno de los ingredientes principales en varias hierbas medicinales chinas que durante mucho tiempo se utilizaron para la terapia antidiabética en numerosas recetas antiguas (Chen y Lin, 2006; Sun, 2008), y los ensayos clínicos modernos a menudo presentan resultados positivos efectos sobre los pacientes diabéticos después del tratamiento a largo plazo con BER (Imanshahidi y Hosseinzadeh, 2008; Yin et al., 2008a; Zhang et al., 2008), todavía existe una controversia sobre su eficacia antidiabética debido a la falta de evidencia (Zuo et al., 2006). En esta investigación, los experimentos in vivo confirmaron que BER tiene un fuerte efecto hipoglucemiante en ratones diabéticos inducidos por STZ después del tratamiento con inyección intravenosa de solución de BER o administración oral de ARM cargadas con BER. Sin embargo, cuando la solución de BER libre se administró solo una vez por vía intragástrica a ratones modelo, no se observaron efectos hipoglucémicos significativos, debido quizás a una absorción intestinal deficiente y una concentración sanguínea demasiado baja que estaba por debajo del nivel efectivo mínimo. Esta puede ser la razón por la cual los informes anteriores sobre la eficacia hipoglucémica de BER se centraron principalmente en el tratamiento a largo plazo, pero pocos en los efectos a corto plazo. Esto también sugiere que, en lugar de las formas de dosificación convencionales, se requiere un sistema eficaz de administración de fármacos, como los ARM, que puede mejorar de manera eficiente la absorción intestinal y la biodisponibilidad para que la administración oral de BER genere una eficacia antidiabética inmediata. Notablemente, como se muestra en la Fig. 8, después de un

período de 6 días de tratamiento repetido con ARM cargados con BER, los BGL de todos los ratones diabéticos inducidos por STZ volvieron al rango normal (2–7 mM). Esto sugiere que el sistema de administración de BER basado en ARM es un medicamento prometedor para curar la diabetes mellitus que afecta a los seres humanos durante mucho tiempo.

Los experimentos in vivo muestran que la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) de las ARM cargadas con BER oral aumentó 2.1 veces en comparación con la de la solución oral en ratones modelo, mientras que la biodisponibilidad (BA) de las ARM aumentó 2.4 veces. Aunque la BA de las ARM cargadas con BER oral todavía no era superior al 20%, la mejora permite a BER ejercer efectos hipoglucémicos significativos en ratones diabéticos. El tiempo de concentración máxima ($t_{m\acute{a}x}$) en los ratones tratados con ARM cargados con BER apareció 2 h después de la solución de BER recibida o totalmente libre. La explicación de este retraso de la droga puede ser que los ARM cargados con BER contenían mucho aceite de MCT y este último alargó notablemente el tiempo de vaciado gástrico de los mamíferos. En consecuencia, este tiempo de vaciado gástrico prolongado dio como resultado una liberación sostenida del fármaco en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, una mayor eficacia. Esta liberación sostenida de medicamentos puede encontrar aplicaciones prácticas y tiene ventajas en la administración oral de medicamentos para la terapia prolongada de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus. El tiempo medio de absorción de BER ($t_1 / 2k_a$) se acortó a la mitad mediante ARM, lo que indica la capacidad del portador para acelerar la absorción del fármaco. Inesperadamente, las constantes de la tasa real de eliminación del fármaco ($k_1 / 2c_l$) de diferentes grupos de dosificación eran valores completamente diferentes y había una gran brecha entre ellas. Una posible explicación para esto es que ciertas enzimas que influyeron en el metabolismo de la BER son inducidas y dependen de las concentraciones sanguíneas del fármaco, lo que lleva a distintas tasas de depuración del medicamento en diferentes formas de dosificación que han exhibido diferentes características de absorción. Otra explicación podría ser que, cuando se absorbía de los tractos gastrointestinales y circulaba en los sistemas de circulación, BER todavía estaba en forma de ARM, por lo tanto, el sistema de administración de ARM es responsable de los perfiles farmacocinéticos de los fármacos. En particular, la vida media de eliminación de BER ($t_1 / 2b$) en ratones para diferentes formulaciones se clasifica en el orden de $t_1 / 2b$ de BER ARM (oral) < $t_1 / 2b$ de solución de BER (oral) < $t_1 / 2b$ de solución de BER (iv), mientras que la cantidad de BER absorbida (AUC) se clasifica en orden de AUC de ARM (oral) > AUC de solución de BER (oral) > AUC de solución de BER (iv), como se puede ver en la Tabla 1 Parece que cuanto mayor es la concentración sanguínea de BER, más rápidamente se elimina. A menudo, la tasa de metabolismo del fármaco y el aclaramiento posterior pueden acelerarse por los mismos fármacos que se clasifican como inductores de enzimas metabolizadoras de fármacos. BER podría ser un potente inductor de enzimas metabolizadoras de fármacos (pero esto aún no se ha demostrado). Por lo tanto, una mayor cantidad de BER en el sistema circulatorio del ratón podría haber inducido más enzimas metabólicas in vivo, lo que resulta en una eliminación acelerada del fármaco.

Cabe señalar que la correlación entre la eficacia antidiabética y la concentración de fármaco en sangre no se estableció entre diferentes patrones de administración, y este esfuerzo recibió resultados confusos (no se muestran los datos). Las AUC tampoco se relacionaron con la eficacia de las drogas. Es difícil hacer una explicación adecuada de esto, ya que los procesos y mecanismos de antidiabética de BER siguen siendo poco claros hasta ahora a pesar de varios informes relacionados (Al-masri et al., 2009; Cui et al., 2009) Sin embargo, argumentamos que, cuando se ven afectadas o activadas por BER, las células de tejido de ratón pueden tomar cierto tiempo para iniciar la absorción de glucosa, pero tanto el tiempo de inicio como la tasa de

absorción pueden depender e influir en muchos factores, incluidos , quizás, forma de dosificación del fármaco y vía de administración. Estos merecen una mayor investigación para que se pueda obtener la formulación óptima basada en un nuevo sistema de administración de fármacos. Además, aclarar estos aspectos es de notable importancia para la administración segura de BER, que manifiesta numerosas actividades farmacológicas y una potente citotoxicidad (Imanshahidi y Hosseinzadeh, 2008), incluida la eficacia anticancerígena y los efectos secundarios en las células normales. En los experimentos in vivo, cuando la solución estéril de BER se inyectó por vía intravenosa en ratones a una dosis de 10 mg / peso corporal, BER mostró poderosos efectos inhibitorios en el sistema nervioso central, y todos los ratones cayeron en un sueño letárgico o incluso exanimación, y algunos incluso murieron de inmediato (los datos no se muestran). Pero estos efectos adversos graves no se notaron en absoluto en los ratones que recibieron BRAZOS cargados con BER. Aunque las tabletas de BER también son una forma de dosificación segura, los efectos hipoglucemiantes generalmente se observaron solo en pacientes que recibieron continuamente el medicamento durante un largo período de varios meses (Yin et al., 2008a; Zhang et al., 2008). Por lo tanto, el sistema de administración de fármacos ARM tiene ventajas sobre las formas de dosificación convencionales de BER en seguridad, conveniencia y eficacia.

En conclusión, en esta investigación se demostró que la BER es un potente agente antidiabético, pero esta eficacia difícilmente se puede lograr utilizando formas de dosificación oral convencionales. Se preparó con éxito un novedoso sistema de administración de fármacos de ARM y se utilizó como portador oral de BER. Los ARM cargados con BER son seguros y pueden mejorar notablemente la biodisponibilidad oral del fármaco y, por lo tanto, la eficacia antidiabética. Este novedoso sistema de administración de BER basado en ARM puede tener aplicaciones prácticas para la terapia antidiabética oral.

Agradecimientos.

Este trabajo fue apoyado en parte tanto por la Fundación de Ciencias Naturales Provinciales de Shandong (Nº de subvención: ZR2010HL067) como por el Fondo de inicio del proyecto J& PhD Faculty S&R. Los autores desean agradecer al Dr. Lingxin Meng del Hospital Popular de Sunshine City por la asistencia en las pruebas de BGL.