

ESTUDIO GALÉNICO DE UNA NUEVA FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS MULTILAMINARES PORTADORES DE ANFOTERICINA B

Irene Quesada Prados, Pablo José Hernández Benavides y Antonio Cerezo Galán.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja s/n. 18071-Granada. España.

Resumen

En este trabajo de investigación hemos obtenido una nueva formulación de liposomas multilaminares con anfotericina B, intentando disminuir los importantes efectos adversos que produce este fármaco, especialmente su nefrotoxicidad.

Se han elaborado diferentes formulaciones. La fórmula con lecitina de yema de huevo, colesterol y anfotericina B, en proporciones molares 2:2:0,4 respectivamente, incorpora la mayor cantidad de anfotericina B en los liposomas: $89,51 \pm 1,39$ %. Los resultados del estudio de estabilidad fueron positivos, perdiendo sólo un 1,81 % de la anfotericina B encapsulada a los 30 días.

Abstract

In this research work we have obtained a new formulation of multilamellar liposomes with amphotericin B, trying to decrease the important adverse effects that produce this drug, specially its nephrotoxicity.

It has been made different formulations. The formula with egg yolk lecithin, cholesterol and amphotericin B, in molar ratios 2:2:0.4 respectively, incorporated the major amount of amphotericin B in liposomes: $89,51 \pm 1,39$ %. The results of the stability study were positive, losing only 1,81 % of the encapsulated amphotericin B at 30 days.

Introducción

La anfotericina B es un antibiótico macrólido poliénico polihidroxilado con un resto aminoazúcar que es sintetizada por

Streptomyces nodosus. Fue descubierta en 1957 (1,2).

Este fármaco presenta la ventaja de tener un amplio espectro de acción, incluyendo levaduras y dermatofitos, por lo que sigue siendo el fármaco de elección en la mayoría de las micosis sistémicas, a pesar de la gran cantidad de efectos adversos que produce, que en muchas ocasiones supone el factor limitante de su utilización en terapéutica. El más importante es la nefrotoxicidad, que puede provocar la interrupción del tratamiento y la aparición de otros cuadros tóxicos (2,3).

La anfotericina B se une a la membrana de los hongos formando canales iónicos. Ésto provoca que se altere la permeabilidad de la membrana lo que da lugar a la muerte celular. Su mecanismo de acción se basa en la afinidad de este fármaco por los esteroides presentes en la membrana de las células eucariotas (mamíferos, hongos y protozoos). Presenta una mayor afinidad por el ergosterol, esteroide mayoritario en la membrana del hongo, que por el colesterol, mayoritario en la membrana celular de los mamíferos, lo que explica su relativa especificidad sobre dichos microorganismos (1,3).

En este trabajo de investigación se ha puesto a punto una nueva formulación de liposomas multilaminares que incorporen una mayor cantidad de este antifúngico, además de asegurar una elevada estabilidad del sistema, en comparación con los preparados liposómicos existentes en el mercado.

Materiales y Métodos

Los materiales utilizados en la elaboración de los liposomas han sido: anfotericina B (Squibb Industria Farmacéutica, S.A.), fosfatidilcolina o lecitina de yema de huevo (Merck) y colesterol (Guinama). Como disolventes se han empleado cloroformo (Lab Scan), dimetilsulfóxido (Lab Scan), disolución tampón fosfato de pH 7,0 (fosfato disódico de hidrógeno, Sigma; fosfato monopotásico de hidrógeno, Sigma) y agua purificada.

El método de obtención se basa en el propuesto por Bangham y cols. (1974): se disuelven los componentes lipídicos (fosfatidilcolina de yema de huevo y colesterol) en cantidad suficiente de cloroformo y por evaporación del mismo a vacío en un rotavapor (Büchi; modelo R-110) incorporado a un baño termostatizado a 37 °C (temperatura mayor que la temperatura de transición de los fosfolípidos: 25-30 °C para la fosfatidilcolina) se obtiene una película fosfolipídica adherida a las paredes del matraz. Esta película se hidrata con una solución tamponada de pH 7,0 a la que previamente se le ha incorporado el principio activo. La suspensión formada se somete a un movimiento rotatorio durante una hora a 37 °C, lo que favorece la formación de los liposomas.

Mediante este método se han obtenido siete formulaciones en las que la concentración de anfotericina B ha sido de 1 mg/ml de suspensión liposomal. En la tabla 1 se recoge la composición y proporciones molares de cada una de las formulaciones elaboradas.

Fórmula nº	Composición	Proporciones molares
1	LEC:COL:Anf B	2:0:0,4
2	LEC:COL:Anf B	2:0,5:0,4
3	LEC:COL:Anf B	2:1:0,4
4	LEC:COL:Anf B	2:2:0,4
5	LEC:COL:α-TOC: :Anf B	2:1:0,02:0,4
6	LEC:COL:SA:Anf B	2:1:2:0,4
7	LEC:COL:SA: :α-TOC:Anf B	2:1:2:0,02:0,4

Tabla 1: Formulaciones de liposomas multilaminares portadores de anfotericina B (LEC= fosfatidilcolina de yema de huevo, COL= colesterol, SA= estearilamina, α-TOC= DL-α-tocoferol, Anf B= anfotericina B).

Una vez obtenida cada fórmula, se debe separar la fracción de principio activo encapsulado en los liposomas de la libre que se encuentra en el medio externo. Para ello se someten a centrifugación (centrífuga Hermle; modelo Z-252 M) durante 45 minutos a 2000 r.p.m.

La determinación del porcentaje de anfotericina B encapsulado se realiza mediante la valoración espectrofotométrica de la fracción libre obtenida tras el proceso de separación que se corresponde con el sobrenadante. A éste se le añade un 5% de dimetilsulfóxido para su disolución y se diluye (1/5) con el blanco (solución de tampón fosfato a pH 7,0 con un 5% de dimetilsulfóxido). A esta mezcla se le determina su absorbancia a 341 nm (espectrofotómetro Perkin-Elmer; modelo lambda 40), elaborando previamente la correspondiente recta de calibrado del principio activo a partir de concentraciones conocidas del mismo. Por diferencia entre la cantidad de principio activo añadido inicialmente y la libre, se obtiene el porcentaje de principio activo encapsulado por los liposomas (4).

De las siete formulaciones iniciales, se seleccionaron tres para realizar un estudio de estabilidad, obteniendo los mejores resultados para este estudio la fórmula nº 4.

El estudio de estabilidad se ha realizado durante 30 días, manteniendo cada una de las muestras a 4 °C. Se ha evaluado la pérdida de anfotericina B encapsulada en función del tiempo y se han caracterizado los liposomas mediante su observación microscópica(4).

Mediante microscopía electrónica de transmisión a día 1, 10, 20 y 30 de su elaboración, se ha observado la variación de la forma y el tamaño de las vesículas en función del tiempo. Para ello, se ha seguido una técnica de tinción negativa en un microscopio Zeiss (modelo EM-902), con una diferencia de potencial de 80 Kw y una magnificación entre 30000 y 85000 aumentos (4, 5).

Resultados y Discusión

En la tabla 2 podemos observar los valores medios de los porcentajes de anfotericina B encapsulada junto con su desviación estándar

para cada una de las siete formulaciones elaboradas.

Fórmula (n°)	Anf. B enc. (%)
1	76,82 ± 1,30
2	65,75 ± 3,83
3	86,56 ± 1,57
4	89,51 ± 1,39
5	50,76 ± 10,02
6	25,70 ± 4,92
7	25,24 ± 7,29

Tabla 2. Porcentajes de anfotericina B encapsulados (n=5 ± desviación estándar) para cada una de las formulaciones elaboradas en el estudio de encapsulación de la anfotericina B en liposomas multilaminares.

En la tabla nº 2 se puede observar que la fórmula que mayor porcentaje de principio activo encapsula es aquella en la que existe una mayor cantidad de colesterol (fórmula 4), debido al propio mecanismo de acción del fármaco, al presentar una elevada afinidad por los esteroides. En la tabla 3 y en la figura 1 se observan los resultados correspondientes al estudio de estabilidad de la fórmula nº4.

Día	Anf. B encap. experimental (%)	Anf. B encap. teórico (%)	Anf. B encap. perdido (%)
1	89,51 ± 1,39	100	0
10	84,50 ± 5,43	94,40	5,60
20	88,52 ± 1,87	98,89	1,11
30	87,89 ± 1,72	98,19	1,81

Tabla 3. Pérdida de anfotericina B encapsulada.

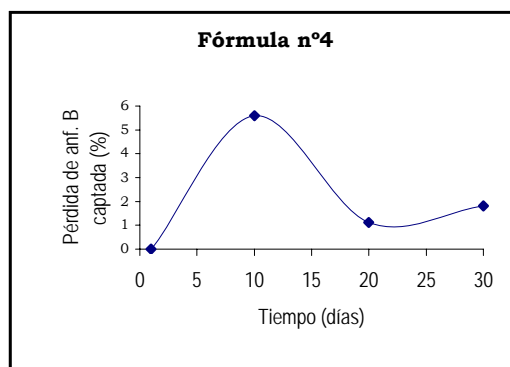


Figura 1: Porcentaje de anfotericina B captado perdido en función del tiempo.

La mayor pérdida de principio activo ocurre a los 10 días y después se puede observar una fase de recaptación de principio activo.

De las siete formulaciones elaboradas, es la que menor porcentaje de principio activo encapsulado perdió a los 30 días después de su elaboración, un 1,81 %.

Tras la caracterización de dicha fórmula mediante microscopia electrónica de transmisión se observa que el diámetro medio de los liposomas se incrementa de forma gradual a lo largo del tiempo. Su diámetro inicial fue de 0,0686 µm, siendo de 0,1151 µm a los 30 días. La distribución del tamaño de los liposomas ha sido también bastante homogénea, lo que es un aspecto fundamental para garantizar la estabilidad de estos vectores.

Bibliografía

- Hartsel, S. and Bolard, J. Amphotericin B: new live for an old drug. T.I.P.S., 17, 445 (1996).
- Robinson, R.F. and Nahata, M.C. A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 24, 249 (1999).
- Dupont, B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 49, 31 (2002).
- Quesada, I., Hernández, P.J. and Cerezo, A. Stability of multilamellar liposomes carrying amphotericin B: loss of encapsulated active principle. European Conference on Drug Delivery and Pharmaceutical Technology, Sevilla, Spain, 2004.
- Carrascosa, J.L. y Castón, J.R. Manual de Técnicas de Microscopia Electrónica (M.E.T.). Aplicaciones Biológicas (Fundamentos y Procedimientos). Renen, J. Y Megías, L. Ed. Universidad de Granada, Granada, 1998.

Autor de contacto:

Dr. Pablo José Hernández Benavides.

pabloj@ugr.es

Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Campus Universitario Cartuja, s/n.

18071-Granada (España).

Tfno.: 34-958-249546.

Fax: 34-958-248958.