

## DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANFOTERICINA B ENCAPSULADO POR MICROESFERAS LIPÍDICAS

*Manuel Paniagua Cerón, Pablo José Hernández Benavides y Antonio Cerezo Galán.*

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

### Introducción

La anfotericina B es un antibiótico macrólido poliénico polihidroxilado con un resto de aminoazúcar, obtenido a partir de cultivos de *Streptomyces nodosus* (1). Presenta un carácter anfótero, con grupos polares (amino y carboxilo en los extremos) y grupos no polares, lo que hace que difícilmente se disuelva en la mayoría de los disolventes, a excepción del dimetilsulfóxido y la dimetilformamida (2).

Es un antifúngico que actúa alterando la permeabilidad de la membrana del hongo al formar canales iónicos en la misma. Posee un amplio espectro, incluyendo dermatofitos y levaduras, aunque su acción sobre dermatofitos es sólo moderada. Se distribuye de forma limitada por los tejidos, aunque alcanza concentraciones adecuadas en los fluidos peritoneal, pleural y articular. Difunde moderadamente a través de la barrera placentaria, pero muy poco a través de la meníngea (incluso en presencia de inflamación). Se une en un 95% a las proteínas plasmáticas. Se metaboliza más del 90% de la dosis administrada, siendo su semivida de eliminación de 15 días (1). Está indicada en el tratamiento de diversas infecciones fúngicas y parasitarias, pero su uso está restringido por su elevada nefrotoxicidad, dificultando su administración a pacientes. Para minimizar esta reacción adversa, existen comercializadas diferentes formulaciones donde la anfotericina B se incorpora a diferentes vectores de fármacos. Dentro de los sistemas de transporte y liberación de fármacos, destacan las microesferas lipídicas.

Están constituidas por glóbulos de grasa rodeados de una monocapa de fosfolípidos e inmersos en un fluido de naturaleza hidrosoluble (solución acuosa de glicerina al 2,60 % m/V) (3). Estos vectores fueron investigados por primera vez por Mishuzima y cols. (1983) que incorporaron diversos principios activos al seno del Intralipid®, emulsión grasa de amplio uso en la terapéutica clínica. Son un sistema disperso tipo emulsión de fase externa acuosa, donde el agente encapsulado (necesariamente liposoluble) se solubiliza en la fase interna del mismo, siendo su diámetro medio siempre inferior a 1 µm. Es importante el tamaño y grado de homogeneidad de las microesferas, debiendo ser éste lo más reducido y homogéneo posible, con objeto de dotar al sistema de una mayor estabilidad y garantizar su administración por vía intravenosa.

El objetivo del presente trabajo ha sido elaborar microesferas lipídicas portadoras de anfotericina B para poner a punto una nueva forma farmacéutica, alternativa a las comerciales, que asegure una mayor seguridad, eficacia y estabilidad, así como determinar la influencia de los componentes de la formulación sobre el porcentaje de principio activo encapsulado.

### Materiales y Métodos

Los materiales empleados para la elaboración de las microesferas lipídicas portadoras de anfotericina B han sido:

- Anfotericina B (Squibb Industria Farmacéutica).
- Aceite refinado de soja (Roig Farma).
- Lecitina de soja (Roig Farma).

## 70 VI Congreso SEFIG y 3<sup>as</sup> Jornadas TF

- Colesterol (Guinama).
- Tween 80 (Roig Farma).
- Glicerina (Roig Farma).

Las diferentes fórmulas elaboradas, con sus concentraciones respectivas, aparecen reflejadas en la tabla 1. En todas ellas se incorporan 50 mg de anfotericina B/200 ml de emulsión:

**Tabla 1:** Formulaciones de microesferas lipídicas portadoras de anfotericina B (AS: aceite refinado de soja; LS: lecitina de soja; COL: colesterol; TW: tween 80; GL: glicerina).

Fórmula (nº)	AS	LS	COL	TW	GL
1	0,685	1,25	0,50	0,50	2,60
2	0,685	1,25	0,50	0,25	2,60
3	0,685	1,25	0,50		2,60
4	0,685	1,25	0,25	0,50	2,60
5	0,685	1,25		0,50	2,60

El método de obtención es el normalizado en nuestro Departamento (4): en primer lugar, se solubilizan por separado los componentes de ambas fases (el principio activo se incorpora junto a los componentes de la fase oleosa) y posteriormente se interponen empleando un agitador mecánico (Ultra-Turrax; T25) a la velocidad de 12000 rpm/15 min en intervalos de 5 minutos. Finalmente se homogenizan por filtración a través de membranas Millipore® de 1.20 µm de diámetro de poro. El volumen final de la muestra se ajusta a 200 ml con cantidad suficiente de agua purificada.

A continuación, se realiza la separación de la fracción de principio activo libre y encapsulado mediante cromatografía de exclusión molecular. Empleamos una columna (K 15/30; Pharmacia Fine Chemicals) empaquetada con un gel de dextrano (Sephadex G50; Pharmacia Fine Chemicals) como fase estacionaria y como eluyente agua purificada. Primero salen las microesferas en un primer pico, mientras que la fracción libre o no encapsulada, debido a su menor peso molecular, eluye después. Se recoge la fracción libre para su posterior valoración espectrofotométrica (Perkin Elmer Lambda 40), a la longitud de onda de 341 nm.

Con los datos de absorbancia obtenidos y a partir de la recta de calibrado previamente determinada, calculamos la cantidad de

anfotericina B libre. Por diferencia entre la cantidad incorporada a la formulación y la libre, se determina el porcentaje de principio activo encapsulado por las microesferas.

### Resultados y Discusión

Los resultados de encapsulación se resumen en la tabla 2. Los valores del porcentaje de anfotericina B encapsulado por cada formulación corresponden a la media de cinco determinaciones, acompañado de su correspondiente desviación estándar.

**Tabla 2:** Resultados de la encapsulación de anfotericina B en microesferas lipídicas (n= 5).

Fórmula (nº)	Anf. B encapsulada (%)
1	85,37 ± 5,27
2	82,37 ± 5,24
3	80,54 ± 5,88
4	80,18 ± 6,15
5	78,16 ± 4,99

En primer lugar, queremos destacar que en todas las fórmulas ensayadas el porcentaje de encapsulación ha estado en torno al 80%, muy superior en la mayoría de las ocasiones al presentado por el resto de sistemas de transporte y liberación de fármacos.

Observamos como en aquellas formulaciones en las que se ha modificado la concentración de tween 80 (fórmulas 2 y 3) apenas se modificaron los porcentajes de encapsulación con respecto a la fórmula tipo (fórmula nº 1), lo que nos indica que esta sustancia tiene poca influencia sobre la encapsulación del principio activo. Sin embargo, su papel en la elaboración de las microesferas lipídicas es fundamental, sobre todo en lo concerniente al tamaño final de las mismas. Dicha sustancia actúa como emulgente formador de fase externa acuosa (O/A) (5).

En cuanto a las fórmulas en las que hemos modificado la concentración de colesterol (fórmulas 4 y 5) observamos como, en su ausencia, el porcentaje de encapsulación de anfotericina B disminuye bastante respecto a la fórmula tipo o fórmula nº 1, lo que parece indicar que dicha sustancia influye positivamente sobre el porcentaje de principio activo encapsulado. Debido a estas diferencias de encapsulación

observadas, suponemos que el principio activo se incorpora en mayor proporción a las microesferas lipídicas en su superficie, hecho justificado por la afinidad de la anfotericina B hacia el colesterol derivada de su propio mecanismo de acción (1). Por tanto, la ausencia de colesterol en la formulación (sustancia que se intercala entre la monocapa fosfolipídica de las microesferas) dificultaría la incorporación del fármaco al vector.

### Bibliografía

1. Catálogo de Especialidades Farmacéuticas. C.G.C.O.F., Madrid, 2002.
2. Asher, I.M., Schwartzman, G. and USASRG, Amphotericin B, in "Analytical Profiles and Drug Substances", vol. 6, Florey, K. Ed., Academic Press, New York, 1977.
3. Mizushima Y., Adv. Drug Del. Rev., 20, 113, (1996).
4. Hernández P.J., Medina M.M., Cerezo A. y Sánchez, J., Pharmaklinik, 3 (4), 163, (1989).
5. Hernández P.J., Medina M.M., Cerezo A. y Sánchez, J., El Farmacéutico Hospitales, 20, 14, (1991).

### *Autor de contacto:*

Pablo José Hernández Benavides.

[pabloj@ugr.es](mailto:pabloj@ugr.es)

Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.  
Campus Universitario Cartuja, s/n.  
18071-Granada (España).

Telf.: 958249546.

Fax.: 958248958.