

INFLUENCIA DEL COLESTEROL SOBRE LA ENCAPSULACIÓN DE ANFOTERICINA B EN LIPOSOMAS MULTILAMINARES

Irene Quesada Prados, 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 fármaco que, a pesar de su antigüedad, se sigue utilizando fundamentalmente en el tratamiento de las micosis de tipo sistémico, no existiendo alternativas terapéuticas realmente eficaces (1). Los efectos adversos que produce son frecuentes e importantes, lo que en muchas ocasiones suponen el factor limitante de su uso en terapéutica, siendo el efecto adverso más grave su nefrotoxicidad, que puede originar la interrupción del tratamiento y dar lugar a la aparición de otros efectos secundarios (1,2).

Actúa alterando la permeabilidad de la membrana del microorganismo al crear canales iónicos en la misma. Esto es debido a que se fija ávidamente a los esteroides presentes en la membrana, preferentemente de células eucariotas. Su afinidad por el ergosterol, presente en la membrana del hongo, es mayor que por el colesterol, mayoritario en la membrana celular de los mamíferos, lo que explica su relativa especificidad sobre dichos microorganismos. A pesar de ello, se desconoce de forma exacta el mecanismo por el cual la anfotericina B atraviesa la pared celular del hongo para alcanzar su lugar de acción (1-4).

La anfotericina B se comercializa en diferentes formas farmacéuticas, como inyectables, cremas, pomadas y comprimidos vaginales, no existiendo formas farmacéuticas por vía oral debido a la baja biodisponibilidad que presentan. Para su administración por vía parenteral intravenosa existen diferentes especialidades farmacéuticas que han ido apareciendo para

paliar los elevados efectos adversos que produce el principio activo, consiguiendo una mayor presencia y concentración del mismo en su lugar de acción. Dentro de éstas destaca el Ambisome® (5), donde el principio se encuentra encapsulado en liposomas unilaminares, Abelcet® (3), que es la asociación del principio activo a un complejo lipídico, y Amphocil® (6), donde el principio activo se une al sulfato sódico de colesterol.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la puesta a punto de una nueva formulación de liposomas portadores de anfotericina B (en este caso liposomas multilaminares) que permitan una mayor incorporación del principio activo y/o una mayor estabilidad del sistema.

Materiales y Métodos

Los materiales empleados en la obtención de los liposomas son: anfotericina B (Squibb Industria Farmacéutica, S.A.), fosfatidilcolina o lecitina de yema de huevo (Merck) y colesterol (Guinama). Como disolventes se han utilizado cloroformo (Lab Scan), dimetilsulfóxido (Lab Scan), disolución de 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 oleosos (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 termostático 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 cuatro formulaciones que se diferencian solamente en la cantidad de colesterol que incorpora cada una de ellas (tabla 1). En todas ellas la concentración de anfotericina B ha sido de 1 mg/ml de suspensión liposomal.

Tabla 1: Formulaciones de liposomas multilaminares portadores de anfotericina B (LEC = lecitina de yema de huevo; COL = colesterol; Anf. B = anfotericina B).

Fórmula (nº)	Proporciones molares		
	LEC	COL	Anf. B
1	2	0	0,4
2	2	0,5	0,4
3	2	1	0,4
4	2	2	0,4

Una vez obtenida la muestra, 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 Hermler; modelo Z 252 M) durante 45 minutos.

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.

Resultados y Discusión

En las tablas 2-5 figuran los resultados obtenidos para cada una de las formulaciones ensayadas. Se indica la cantidad de principio activo libre (mg/ml) y encapsulado (mg/ml), así como los porcentajes de anfotericina B captados por los liposomas en cada caso.

En dichas tablas se indican los valores puntuales obtenidos en las cinco muestras elaboradas para cada formulación, además del valor encapsulado medio y su correspondiente desviación estándar.

Tabla 2: Encapsulación de anfotericina B en liposomas multilaminares. Fórmula 1.

Fórmula 1		
Anf. B libre (mg/ml)	Anf. B enc. (mg/ml)	Anf. B enc. (%)
0,247	0,753	77,62
0,259	0,741	76,60
0,237	0,763	78,60
0,274	0,726	75,84
0,279	0,721	75,42

76,82 ± 1,30

Tabla 3: Encapsulación de anfotericina B en liposomas multilaminares. Fórmula 2.

Fórmula 2		
Anf. B libre (mg/ml)	Anf. B enc. (mg/ml)	Anf. B enc. (%)
0,337	0,663	69,50
0,421	0,579	60,87
0,341	0,659	69,14
0,422	0,578	62,79
0,392	0,608	66,45

65,75 ± 3,83

Tabla 4: Encapsulación de anfotericina B en liposomas multilaminares. Fórmula 3.

Fórmula 3		
Anf. B libre (mg/ml)	Anf. B enc. (mg/ml)	Anf. B enc. (%)
0,158	0,842	86,06
0,166	0,834	85,02
0,163	0,837	85,28
0,128	0,872	88,46
0,133	0,867	87,97

86,56 ± 1,57

Tabla 5: Encapsulación de anfotericina B en liposomas multilaminares. Fórmula 4.

Fórmula 4		
Anf. B libre (mg/ml)	Anf. B enc. (mg/ml)	Anf. B enc. (%)
0,114	0,886	89,66
0,124	0,876	89,12
0,123	0,877	89,39
0,139	0,861	87,75
0,095	0,905	91,63

89,51 ± 1,39

La tabla número 6 recoge todos los valores medios del porcentaje de anfotericina B encapsulado junto a su desviación estándar para las cuatro formulaciones de liposomas elaboradas.

Tabla 6: Encapsulación de anfotericina B en liposomas multilaminares (n= 5).

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

En primer lugar, hay que destacar los elevados porcentajes de anfotericina B encapsulados en todas las muestras ensayadas (tabla 6). Así, la fórmula n° 1 (relación molar LEC:COL 2:0; tabla 2) encapsula un 76,82 ± 1,30 %, la n° 2, donde ya se incorpora colesterol (relación molar LEC:COL 2:0,5; tabla 3), reduce dicho porcentaje al 65,75 ± 3,83 %. Si se continúa incrementando la cantidad de colesterol en la formulación se aumenta la cantidad y el porcentaje de principio activo encapsulado, como se puede apreciar en la fórmula n° 3 (relación molar LEC:COL 2:1; tabla 4) que encapsula un 86,56 ± 1,57 % y en la n° 4

(relación molar LEC:COL 2:2; tabla 5) con un 89,51 ± 1,39 %.

Los resultados anteriores confirman que la anfotericina B, sustancia insoluble en la mayoría de los disolventes y de características anfóteras, se fija selectivamente a los esteroides, en este caso al colesterol incorporado a la formulación. Este hecho concuerda con el mecanismo de acción propuesto para dicha sustancia anteriormente descrito y que supone la especificidad de la misma sobre la membrana de los hongos frente a la membrana celular de mamíferos (1).

Bibliografía

1. Carver, P.L., Invasive Fungal Infections, in Pharmacotherapy-A Pathophysiologic Approach, 3ª Ed., Ed. Appleton & Lange, Stanford (Connecticut), 1997.
2. Bekersky, I., Fielding R.M., Buell, D., and Laurence, I., Pharm. Sci. Technol. Today, 2 (6), 230, (1999).
3. Rapp, R.P., Gubbins, P.D. and Evans, M.E., Ann. Pharmacother., 31, 1174, (1997).
4. Resat, H., Sungur, F.A., Baginski, M., Borocuski, E. and Aviyente, V., J.Computer-Aided Mol. Design, 14 (7), 689, (2000).
5. Bekersky, I., Boswell, G.W., Hiles, R., Fielding, R.M., Buell, D. and Walsh, T.J., Pharm. Res. 17 (12), 1494, (2000).
6. Guo, L.S.S., Adv. Drug Del. Rev., 47, 149, (2001).

Autor de contacto:

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).

Tel.: 958249546.

Fax.: 958248958.