

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN
FARMACOTÉCNICA Y FARMACOLÓGICA DE NUEVAS
FORMULACIONES PARENTERALES DE
ANFOTERICINA B**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Begoña Brime Beteta

Bajo la dirección de las Doctoras:

Paloma Frutos Cabanillas
Gloria Frutos Cabanillas
Paloma Ballesteros Papantonakis

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2023-4

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA



**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN
FARMACOTÉCNICA Y FARMACOLÓGICA DE NUEVAS
FORMULACIONES PARENTERALES DE
ANFOTERICINA B**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR:
BEGOÑA BRIME BETETA

DIRECTORES:
DR. DÑA PALOMA FRUTOS CABANILLAS
DR. DÑA GLORIA FRUTOS CABANILLAS
DR. DÑA Mª PALOMA BALLESTROS PAPANTONAKIS

MADRID, 2002

Expreso mi agradecimiento:

Al Dr. D. José Luis Lastres García, como Director del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica por haberme permitido realizar esta Tesis en el Departamento a su cargo.

A las Dras. Paloma y Gloria Frutos, como Directoras de esta Tesis Doctoral, por haberme acogido bajo su tutela, por su enorme paciencia, por su apoyo y dedicación durante estos años en todo momento, no pocas veces con desinteresado sacrificio.

A la Dra. M^a Paloma Ballesteros también Directora de esta Tesis Doctoral y a los Drs. Juan, Santiago y Susana Torrado, por su ayuda y sus consejos.

Al Dr. D. William Jusko, a y a todo su equipo de investigación de la Universidad del Estado de Nueva York en Buffalo (Estados Unidos) donde realicé todo el análisis farmacocinético de los datos de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. D. Paolo Colombo como Director del Departamento de Farmacia de la Universidad de Parma (Italia), al Dr. D. Ian Kellaway, Profesor del Departamento de Farmacia de la Universidad de Londres (Reino Unido) y al Dr. D. José Juárez, Profesor del Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en Lima (Perú) que me han permitido realizar estancias en sus Universidades y aumentar mis conocimientos en el campo de la Tecnología Farmacéutica.

A las Dras. Miren Zamacona, María de los Ángeles Elorza, Ana Nieto y Pilar Bringas por su gran ayuda en el estudio farmacocinético y toxicológico de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. D. César Nombela, como Director del Departamento de Microbiología II de la Universidad Complutense de Madrid por permitirme realizar el último capítulo de la Tesis en su Departamento y a la Dra. Gloria Molero por enseñarme y orientar los estudios de eficacia de esta Tesis Doctoral.

A Ana Lucía, Paloma, Rosa, Covadonga, José Antonio, Claudia, Celia, David, Marco, Eva y Rodrigo por acompañarme durante todos estos años de trabajo y por compartir conmigo un montón de buenos momentos.

A mis amigas del colegio, de la universidad, a mis amigos del grupo Santa María y a los de las Misioneras de la Caridad, especialmente a la hermana Teena María, al Padre Ignacio, al Padre Pedro, a Antonio, a Gonzalo y a todos aquellos que me han dado su cariño y amistad a lo largo de estos años.

A mis padres, a mi hermana Covadonga, a mi abuela y en general a toda mi familia por su constante aliento.

Finalmente, con todo mi corazón, "Deo Gratias".

ÍNDICE

<u>PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO</u>	1
<u>PARTE TEÓRICA</u>	
<u>MICROEMULSIONES</u>	5
1. Introducción	5
1.1. Concepto y denominación	5
1.2. Estructura	7
1.3. Aplicaciones industriales	8
1.4. Propiedades fisicoquímicas	8
2. Teorías sobre la formación y estabilidad termodinámica	8
2.1. Interpretación en términos de las propiedades interfaciales	9
2.2. Interpretación en términos de solubilización	9
2.3. Estabilidad termodinámica	10
3. Aspectos relativo a la formulación	11
3.1. Formulación con tensioactivos no iónicos	11
3.2. Formulación con tensioactivos iónicos	12
3.3. Componentes de las microemulsiones de uso farmacéutico	13
3.4. Tipos de cosurfactantes empleados para la preparación de microemulsiones	14
4. Estructura y técnicas de caracterización	16
4.1 Estructura	16
4.2 Técnicas de caracterización	17
5. Aplicaciones farmacéuticas de las microemulsiones	20
5.1. Introducción	20
5.2. Administración transdérmica de microemulsiones	22
5.3. Administración parenteral, pulmonar y ocular de microemulsiones	24
5.4. Administración oral de microemulsiones	25
5.5. Ventajas de las microemulsiones	27
<u>ANFOTERICINA B</u>	29
1. Introducción	29
2. Mecanismo de acción	29
3. Nuevos fármacos antifúngicos	32
4. Interacciones de la AmB con otros fármacos	35
5. Nuevas formulaciones de AmB	37
5.1. Mecanismo de acción	38
5.2. Composición y estructura	39
5.3. Costes de la terapia	39
6. Farmacocinética de AmB	40
6.1. Aplicación de los ordenadores en farmacocinética	40

6.2. Farmacocinética de AmB	41
6.2.1. Complejos lipídicos de AmB (ABLCL, Abelcet®)	43
6.2.2. Dispersión coloidal de AmB (ABCD, Amphotec®)	44
6.2.3. AmB liposomal (L-AmB, AmBisome®)	44
6.2.4. Emulsiones lipídicas de AmB	46
7. Toxicidad de AmB	46
7.1. Mecanismos de toxicidad	46
7.2. Incompatibilidades de la AmB	48
7.3. Efectos adversos de la AmB	48
7.4. Estrategias en la prevención de la nefrotoxicidad y los efectos adversos	49
7.5. Efectos de la AmB en ensayos clínicos de laboratorio	50
7.6. Toxicidad de las nuevas formulaciones lipídicas de AmB	53
8. Espectro de acción y resistencia	54
8.1. Espectro de acción	54
8.2. Resistencia	57
8.3. Desarrollo de estudios in vivo de la eficacia de agentes antimicrobianos	57
8.4. Posología de AmB	58
8.5. Eficacia de las nuevas formulaciones lipídicas de AmB	58
8.6. Relación concentración-efecto	59
<u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	
<u>ESTUDIO ANALÍTICO DEL PRINCIPIO ACTIVO</u>	63
1. Materiales empleados	63
2. Espectrofotometría UV/VIS	64
3. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)	66
4. Validación del sistema cromatográfico	67
4.1. Parámetros cromatográficos para la calibración del sistema	67
5. Validación de los métodos analíticos	68
5.1. Espectrofotometría UV/VIS	70
5.2. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) en metanol	74
5.3. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) en plasma	77
6. Límite de anfotericina A	81
<u>MICROEMULSIONES DE ANFOTERICINA B</u>	85
1. Componentes de la microemulsión	85
1.1. Miristato de isopropilo	85
1.2. Brij® 96V	86
1.3. Lecitina	86
1.4. Manitol	87
2. Preparación de las microemulsiones	88

3. Incorporación de la AmB a las microemulsiones	91
4. Estudios reológicos y de viscosidad	91
5. Estudios de dilución de las microemulsiones	94
6. Estudios del tamaño de gotícula de la fase interna	94
7. Determinación del pH de las microemulsiones	95
8. Estabilidad de las microemulsiones	95
8.1. Test de centrifugación	95
8.2. Ciclos de congelación-descongelación	95
8.3. Estudios de estabilidad física y química	96
9. Liofilización de las microemulsiones	97
9.1. Caracterización de las microemulsiones liofilizadas	97
9.1.1. Aspecto, color y olor de las microemulsiones liofilizadas	97
9.1.2. Contenido en humedad de las microemulsiones liofilizadas	97
9.1.3. Reconstitución, aspecto y pH de las microemulsiones liofilizadas	98
9.1.4. Contenido en AmB de las microemulsiones liofilizadas	98
9.1.5. Tamaño de gotícula de las microemulsiones reconstituidas	98
9.1.6. Comportamiento reológico y viscosidad de las microemulsiones reconstituidas	99
9.2. Estabilidad de las microemulsiones liofilizadas de AmB	100
9.3. Estabilidad a la temperatura de las microemulsiones reconstituidas de AmB	108
9.4. Estabilidad de las microemulsiones reconstituidas de AmB a los ciclos de congelación-descongelación	109
9.5. Estabilidad de las microemulsiones reconstituidas de AmB en el test de centrifugación	111
<u>ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS DE MICROEMULSIONES DE ANFOTERICINA B</u>	113
1. Administración intravenosa en bolus en dosis única	114
1.1. Animales de experimentación	114
1.2. Dosis de fármaco administradas	114
1.3. Extracción y análisis de las muestras	115
1.4. Análisis farmacocinético	116
1.5. Resultados obtenidos	117
1.6. Análisis no compartimental	125
1.7. Análisis compartimental	128
2. Administración intravenosa en bolus en dosis única: Estudio de proporcionalidad según la dosis administrada	136
2.1. Animales de experimentación	136
2.2. Dosis de fármaco administradas	136
2.3. Extracción y análisis de las muestras	137
2.4. Análisis farmacocinético	137
2.5. Resultados obtenidos	137
2.6. Análisis no compartimental	143

2.7. Análisis compartimental	144
2.8. Otros estudios realizados en conejos de proporcionalidad según la dosis administrada de nuevas formulaciones de AmB	147
3. Administración por perfusión intravenosa en dosis múltiple	149
3.1. Animales de experimentación	149
3.2. Dosis de fármaco administradas	149
3.3. Extracción y análisis de las muestras	151
3.4. Análisis farmacocinético	151
3.5. Resultados obtenidos	151
3.6. Análisis compartimental	157
<u>ESTUDIOS DE TOXICIDAD AGUDA DE MICROEMULSIONES DE ANFOTERICINA B</u>	163
1. Toxicidad aguda en dosis única en ratones	163
1.1. Animales de experimentación	163
1.2. Dosis de fármaco administradas	163
1.3. Esterilización de las muestras	164
1.4. Cálculo de la Dosis Letal 50 (LD ₅₀)	166
1.4.1. Modelo binario de tipo probit	167
1.4.2. Estimación del modelo binario de tipo probit por el método de máxima verosimilitud	167
1.4.3. Determinación de la DL ₅₀	169
1.4.4. Comportamiento de la estimación de la DL ₅₀ por máxima verosimilitud	169
2. Toxicidad subaguda en dosis múltiple en ratones	174
2.1. Animales de experimentación	174
2.2. Dosis de fármaco administradas	174
2.3. Análisis de las muestras	175
2.4. Resultados obtenidos	175
2.5. Análisis renal histopatológico	177
2.6. Análisis de los parámetros sanguíneos	181
3. Toxicidad subaguda en dosis múltiple en conejos	183
3.1. Animales de experimentación	183
3.2. Dosis de fármaco administradas	183
3.3. Extracción y análisis de las muestras	184
3.4. Resultados obtenidos	184
<u>ESTUDIOS DE EFICACIA DE MICROEMULSIONES DE ANFOTERICINA B</u>	187
1. Estudios de eficacia en ratones sanos	187
1.1. Animales de experimentación	187
1.2. Modelo de infección con <i>Candida albicans</i>	187
1.3. Dosis de fármaco administradas	187
1.4. Medida de la colonización de las cepas de <i>Candida albicans</i> en los órganos diana durante la infección sistémica	188
1.5. Análisis estadístico	189
1.6. Resultados obtenidos	189

1.6.1. Eficacia de M-AmB	189
1.6.2. Comparación de la eficacia de M-AmB y D-AmB en un modelo murino de micosis sistémica	190
1.6.3. Comparación de la supervivencia de M-AmB y D-AmB en un modelo de candidiasis sistémica 72 horas después de iniciada la inoculación	196
2. Estudios de eficacia en ratones neutropénicos	198
2.1. Animales de experimentación	198
2.2. Inducción de neutropenia	198
2.3. Modelo de infección con <i>Candida albicans</i>	199
2.4. Dosis de fármaco administradas	199
2.5. Medida de la colonización de las cepas de <i>C. albicans</i> en los órganos diana durante la infección sistémica	200
2.6. Resultados obtenidos	200
<u>CONCLUSIONES</u>	205
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	207

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO

La anfotericina B (AmB) es un antibiótico macrólido poliénico polihidroxiado con un resto de aminoazúcar, obtenido a partir de cultivos de *Streptomyces nodosus* (Gold, W. et al. 1956). Es la droga antimicótica que mayor espectro de actividad tiene de todos los antimicóticos sistémicos, y debido a su mayor potencia como antifúngico y al menor desarrollo de resistencias del agente patógeno frente a dicho fármaco, hoy en día sigue siendo el fármaco de elección en el tratamiento de micosis sistémicas oportunistas, muy frecuentes en estados de inmunodepresión asociados a patologías como el SIDA y el cáncer (Meyer, R. D. 1992).

La forma comercial de la AmB recibe el nombre de Fungizona[®] y consiste en una solución micelar del principio activo con deoxicolato sódico que se administra por vía intravenosa debido a que presenta una biodisponibilidad oral prácticamente nula. Esta formulación fue descrita en 1958 por Bartner y sus colaboradores, y lleva utilizándose desde entonces hasta la actualidad (Bartner, E. et al. 1958). Los efectos adversos de este medicamento son en general frecuentes e importantes, por ello se han desarrollado nuevas formulaciones del compuesto tales como liposomas (Ambisome[®], Vestar Ltd.) y complejos lipídicos (Amphocil[®], Zeneca Ltd. y Abelcet[®], The Liposome Company Inc.), con miras a una disminución de la toxicidad del mismo (Guo, L. S. et al. 1993).

En la actualidad la formulación innovadora, Fungizona[®], continua siendo la más utilizada debido a que las nuevas formulaciones desarrolladas plantean serios problemas referidos a la disponibilidad, idoneidad y precio de las materias primas (Lang, J. K. et al. 1990); esterilidad y apirogenez (Amselem, S. et al. 1990); producción a gran escala (Barthel, D. et al. 1988); reproducibilidad del proceso de producción en términos de distribución de tamaños, eficacia de encapsulación, perfiles de liberación y presencia de productos no deseados; estabilidad química, reacciones de hidrólisis (Grit, M. et al. 1992) y peroxidación (Kucuk, O. et al. 1992); estabilidad física, agregación y fusión de las vesículas (Simon, S. A. et al. 1991), pérdidas del principio activo encapsulado (Offringa, J. C. et al. 1987), entre otros.

Hoy en día se siguen realizando investigaciones dirigidas a la búsqueda de nuevas formulaciones del fármaco que disminuyan la toxicidad del mismo y además resuelvan los problemas de estabilidad y viabilidad asociados a las formas de administración desarrolladas hasta el momento.

Las microemulsiones de AmB realizadas por el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid pueden ser una alternativa para la administración de este fármaco reduciendo considerablemente su toxicidad, ya que el empleo de sistemas dispersos coloidales de tamaños de partícula menores a 1 μm pueden lograr una vectorización pasiva del fármaco a su lugar de acción (Moreno, M. et al. 2001). Esto permite mejorar el índice terapéutico del fármaco así como proteger al organismo de efectos secundarios del mismo

Por ello, dado que la línea de investigación del Departamento ha obtenido unas microemulsiones de AmB que presentan buenas condiciones tecnológicas, el objetivo de esta Tesis es el estudio farmacológico de las mismas; de forma paralela se han intentado mejorar estas microemulsiones introduciendo cambios en sus parámetros de diseño, se han

caracterizado estas nuevas microemulsiones y asimismo se ha hecho el estudio farmacológico de las más idóneas.

Para desarrollar este objetivo se realiza el siguiente planteamiento:

↑ **Optimización de microemulsiones de AmB**, que incluye:

- Diseño de diversas formulaciones del fármaco en microemulsiones parenterales. Comparación de distintas técnicas de emulsificación y de distintos tensioactivos y caracterización de las microemulsiones por PCS, y estudios de viscosidad. También se evaluará el contenido en principio activo de las microemulsiones y su estabilidad.

↑ **Estudios farmacocinéticos**, que incluye:

- Realización de un ensayo piloto usando conejos como animales de experimentación mediante la administración intravenosa en bolus de dosis únicas de fármaco para conocer los parámetros farmacocinéticos de la AmB como son: volumen de distribución, semivida y aclaramiento del fármaco en esta nueva forma farmacéutica. Se analizarán las concentraciones plasmáticas del fármaco mediante el uso de cromatografía en capa líquida (HPLC).
- Puesta a punto y validación de métodos analíticos que nos permitan el estudio farmacocinético de la AmB en plasma de una forma sensible, exacta y precisa.
- Realización de estudios comparativos de la farmacocinética de la AmB administrada en microemulsiones y de la farmacocinética de la forma comercial de AmB (Fungizona[®]) mediante la administración intravenosa en bolus de dosis únicas de fármaco.
- Realización de estudios farmacocinéticos tras la administración por perfusión intravenosa de las microemulsiones en comparación con la formulación comercial Fungizona[®].

↑ **Estudios de toxicidad aguda**, que incluye:

- Estudios de toxicidad aguda en dosis única en ratones de las formulaciones desarrolladas y seleccionadas en comparación con la formulación comercial Fungizona[®]. Cálculo de la DL₅₀ (dosis letal 50) por diversos métodos.
- Realización de estudios “in vivo” de la toxicidad subaguda de las microemulsiones de AmB tras la administración de diferentes dosis de fármaco durante cinco días consecutivos en ratones, en comparación con la formulación comercial Fungizona[®].
- Análisis de diversos parámetros sanguíneos indicadores de nefrotoxicidad y análisis histopatológico de los riñones de los ratones tras recibir una dosis múltiple de fármaco durante 5 días.

- Realización de estudios “in vivo” de la toxicidad subaguda de las microemulsiones de AmB tras la administración por perfusión intravenosa de diferentes dosis de fármaco durante cuatro días consecutivos en conejos, en comparación con la formulación comercial Fungizona[®].
- Análisis de diversos parámetros sanguíneos indicadores de nefrotoxicidad de los conejos tras recibir una dosis múltiple de fármaco durante 4 días.

↑ **Estudios de eficacia**, que incluye:

- Realización de estudios de eficacia del fármaco en ratones inmunocompetentes para comprobar si dichas microemulsiones enmascaran la actividad antimicótica del fármaco. Se emplearán distintas dosis de fármaco en distintas condiciones de infección y se compararán con la formulación comercial Fungizona[®].
- Medida del tiempo de supervivencia y de la colonización de las cepas de *Candida albicans* en los órganos diana, riñones y cerebro, durante la infección sistémica en ratones inmunocompetentes.
- Realización de estudios de eficacia del fármaco en ratones neutropénicos para comprobar si dichas microemulsiones enmascaran la actividad antimicótica del fármaco. Se emplearán distintas dosis de fármaco en distintas condiciones de infección y se compararán con la formulación comercial Fungizona[®].
- Medida del tiempo de supervivencia y de la colonización de las cepas de *Candida albicans* en los órganos diana, riñones y cerebro, durante la infección sistémica en ratones neutropénicos.

↑ **Análisis estadístico** de los datos derivados de cada una de cada una de las fases de la investigación.

PARTE TEÓRICA

MICROEMULSIONES

1. INTRODUCCION

1.1. Concepto y denominación

Las microemulsiones son soluciones coloidales, transparentes, termodinámicamente estables, en las que pueden coexistir cantidades equivalentes de líquidos no miscibles, como por ejemplo agua y un solvente no polar, debido a la presencia de uno o varios compuestos tensioactivos con un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) adecuado.

Soluciones coloidales con estas características fueron descritas por primera vez en 1943 por Hoar y Schulman (Hoar, T. P. et al. 1943), siendo inicialmente denominadas soluciones micelares hinchadas, emulsiones transparentes, micelas solubilizadas, etc. El término microemulsión fue introducido también por Schulman (Schulman, J. H. et al. 1959) y es la denominación que ha prevalecido.

También se define a las microemulsiones como sistemas acuosos y oleosos fluidos, transparentes y termodinámicamente estables, estabilizados por un surfactante generalmente acompañado de un cosurfactante, el cual puede ser un alcohol o una amina de cadena corta u otra molécula de carácter anfifílico débil (Aboofazeli, R. et al, 1994).

Aspecto de la dispersión	Ejemplo de dispersión	Diámetro medio de las partículas		
		10^{-6} m (μ)	10^{-9} m (nm)	10^{-10} m (Å)
Visible por el ojo	Suspensión arcillosa	500	500 000	-
Límite de visibilidad	Mezcla de almidón	100	100 000	-
Opaco lechoso	Emulsión	10	10 000	-
Lechoso muy blanco	Emulsión homogénea	1	1 000	10 000
Lechoso azulado	Límite de la emulsión	0,1	100	1 000
Transparente azulado	Microemulsión	0,05	50	500
Opalescente	Microemulsión	0,01	10	100
Transparente	Solución micelar	0,002-0,006	2-6	20-60

Tabla 1. Aspecto de las dispersiones.

Aunque el término microemulsión induce similitud con el de emulsión, existen importantes diferencias entre ambas dispersiones coloidales, no sólo en cuanto a su aspecto y propiedades sino también en el diámetro medio de las partículas (Tabla 1). La diferencia fundamental entre las emulsiones y las microemulsiones es la inestabilidad termodinámica de las emulsiones que puede conllevar a una separación de fases (Shinoda, K. et al. 1987). Otra diferencia importante es la relativa a su apariencia y su formación, mientras que las emulsiones son sistemas dispersos turbios que necesitan un aporte de energía mecánica para su formación, ya que no son termodinámicamente estables, las microemulsiones son claras o translúcidas y se forman espontáneamente al poner en contacto los componentes y

esto tiene grandes implicaciones en el coste de su producción a gran escala. El tamaño de las gotas de una microemulsión (20-500 Å) es muy inferior al de las gotas de una emulsión (superiores a 1000 Å), es decir, aproximadamente unas 100 veces inferior. Asimismo, en determinadas microemulsiones las fases que las constituyen pueden ser continuas.

Recientemente se están comenzando a utilizar los sistemas autoemulsificables de liberación de fármacos SEDDS (self-emulsifying drug delivery systems), para mejorar la disolución y absorción de principios activos lipofílicos. Los SEDDS son soluciones isotrópicas claras y transparentes formadas por mezclas de aceites y surfactantes no iónicos en ausencia de agua que representan un vehículo eficiente para la administración in vivo de emulsiones.

Así mismo también existen los sistemas automicroemulsificables de liberación de fármacos SMEDDS (self-microemulsifying drug delivery systems), no son microemulsiones propiamente dichas, pero sí se pueden considerar sistemas muy próximos. Los SMEDDS incluyen generalmente una mezcla de tensioactivo, aceite y fármaco que cuando se introduce en el organismo se dispersa rápidamente en forma de gotículas de aproximadamente el mismo rango de tamaño que aquellas observadas en las microemulsiones. Una vez dispersado el sistema se espera que tenga un comportamiento "in vivo" semejante al de las microemulsiones *O/A*.

Por otra parte, también en ocasiones se han identificado las microemulsiones con las soluciones micelares. Sin embargo, las microemulsiones se diferencian de las soluciones micelares por su mayor capacidad de solubilización y su mayor estabilidad termodinámica, con un mínimo aumento en el tamaño de gota.

Sistemas de liberación de fármacos	Ventajas	Desventajas
Micelas	Baja viscosidad, pequeño tamaño de gotícula, fácil preparación y muy estables	Baja solubilización y toxicidad potencial de los tensioactivos
Microemulsiones	Alta solubilidad de fármacos, pequeño tamaño de gotícula, fácil preparación y muy estables	Porcentaje elevado de tensioactivos, toxicidad potencial de los tensioactivos y la solubilidad de fármacos está influenciada por condiciones ambientales
Emulsiones	Pequeña cantidad de tensioactivos y alta solubilidad del fármaco	Alta viscosidad, inestabilidad y tamaño de gotícula grande.
Liposomas	Formados por lecitina y colesterol, presentes en el organismo	Alta viscosidad, dificultad de preparación, a menudo se degradan tras ser administrados.
Nanopartículas	Estabilidad muy alta, y degradación lenta en el organismo por lo que se usan en vacunas.	Solubilidad limitada de fármacos, dificultad de preparación, dificultad para controlar el tamaño de gotícula

Tabla 2. Ventajas y desventajas de distintos sistemas de liberación de fármacos.

En las Tablas 2 y 3 se describen las propiedades físicas de las microemulsiones y de otros sistemas dispersos y de liberación de fármacos con sus ventajas y desventajas.

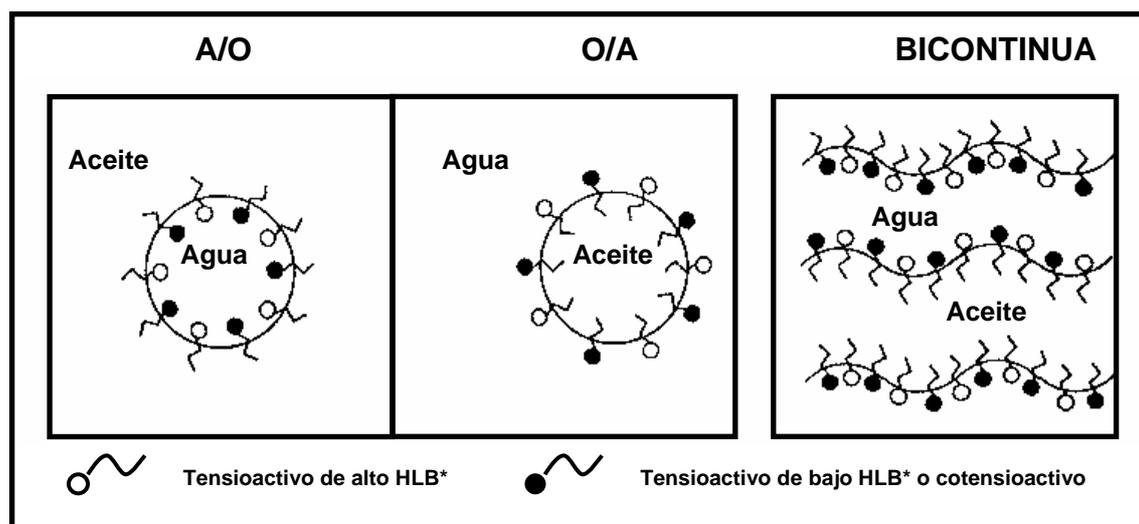
Características	Micelas	Microemulsiones	Emulsiones	Liposomas
Obtención espontánea	Sí	Sí	No	No
Estabilidad termodinámica	Sí	Sí	No	No
Turbidez	Transparente	Transparente	Turbio	Turbio
Tamaño de partícula	< 0.01 micras	< 0.1 micras	0.5-5 micras	0.025-25 micras
Uso de cotensioactivo	No	Sí	No	No
Concentración de tensioactivo	< 5%	>10%	1-20%	0.5-20%
Concentración de la fase dispersa	< 1%	1-30%	1-30%	1-30%

Tabla 3. Características físicas de distintos sistemas de liberación de fármacos.

1.2. Estructura

Las microemulsiones se forman bajo una amplia gama de concentraciones de tensioactivo, de proporciones agua/solvente lipófilo, de rangos de temperatura, etc., y presentan una variabilidad estructural muy amplia. Inicialmente, por similitud con las emulsiones fueron descritas como sistemas en los que una de las fases se halla dispersa en la otra formando microgotas de un tamaño comprendido entre 10 y 100 nm.

Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que además de las microemulsiones formadas por microgotas de agua (de tipo A/O) o de solvente lipófilo (de tipo O/A), existen también microemulsiones con estructura bicontinua en las que tanto la fase acuosa como la fase oleosa presentan continuidad macroscópica (Figura 1).



*HLB: balance hidrofílico-lipofílico

Figura 1. Esquema de la estructura de microemulsiones directas (O/A), inversas (A/O) y bicontinuas.

1.3. Aplicaciones industriales

Las aplicaciones industriales de las microemulsiones, son muy variadas y están siendo utilizadas por un gran número de industrias tales como: química, de detergentes, de sangre artificial, alimentarias, farmacéuticas, etc. Algunas de las aplicaciones más importantes son como medio de reacción, como catalizadores no específicos, en la recuperación terciaria del petróleo, en procesos de extracción, como formulaciones farmacéuticas, cosméticas, fitosanitarias, etc., por su gran capacidad de solubilización y también porque mejoran la velocidad de reacciones químicas en medios heterogéneos y aumentan los rendimientos (Chen, D. H. et al. 2001, Lee, M. H. et al. 2000, Hanaoka, T. et al. 2001).

1.4. Propiedades fisico-químicas

Las microemulsiones presentan un conjunto de propiedades físico-químicas de gran interés teórico y tecnológico, entre las que destacan las siguientes:

- Formación espontánea a temperatura ambiente al ponerse en contacto sus componentes, debido a su estabilidad termodinámica.
- Homogeneidad macroscópica, es decir, transparencia e isotropía óptica, así como heterogeneidad microscópica debido a la existencia de películas interfaciales de moléculas de tensioactivo que separan localmente la fase acuosa de la fase orgánica.
- Valores de tensión interfacial extraordinariamente bajos, del orden de 10^{-3} mN/m, entre las fases acuosa y orgánica.
- Gran capacidad de solubilización tanto de compuestos solubles en agua como solubles en solventes no polares en el mismo sistema.
- Se comportan como líquidos newtonianos y de viscosidades bajas, similares a la del agua.
- Capacidad de ser filtradas.

2. TEORIAS SOBRE LA FORMACION Y ESTABILIDAD TERMODINAMICA

2.1. Interpretación en términos de las propiedades interfaciales

El concepto primitivo sobre la naturaleza de las microemulsiones, desarrollado por Schulman y su escuela, fue una consecuencia directa de su tratamiento experimental. Un experimento típico de formación de una microemulsión consistía en adicionar un alcohol de longitud de cadena media (por ejemplo, pentanol) a una emulsión formada por agua e hidrocarburo estabilizada por un tensioactivo iónico (un jabón). A una determinada concentración de alcohol, se producía una transición espontánea en la que la emulsión (sistema ópticamente no transparente) se convertía en un sistema completamente transparente y dotado de estabilidad: una microemulsión.

Para explicar esta emulsificación espontánea, así como su estabilidad termodinámica, Schulman postuló la existencia de una tensión interfacial negativa; al añadir alcohol a la emulsión estabilizada por un tensioactivo iónico, la tensión interfacial entre el agua y el aceite iría disminuyendo progresivamente hasta que, para un cierto valor de concentración del alcohol, la tensión interfacial resultaría negativa. Ello implicaría la liberación de una energía libre superficial capaz de romper las gotas de la emulsión en unidades cada vez más pequeñas que no serían observables a simple vista.

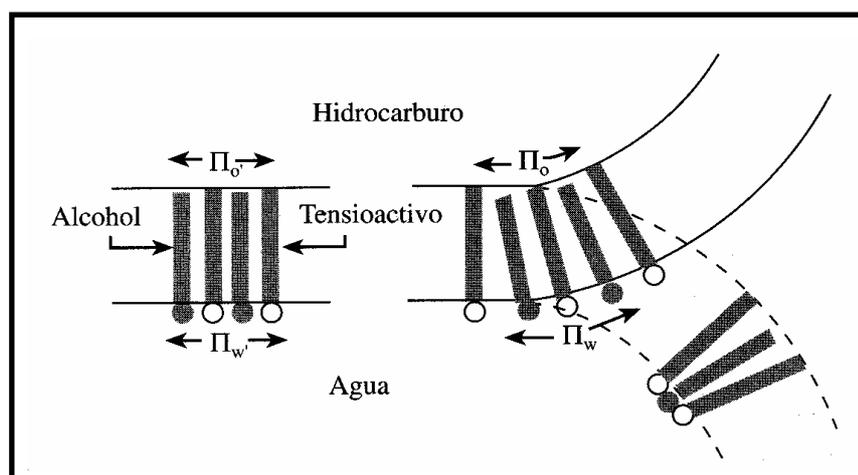


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de curvatura interfacial al formarse una microemulsión.

Prince (Prince, L. M. 1967) amplió los postulados de Schulman al considerar el espesor de la monocapa interfacial e introdujo el concepto de tensión diferencial entre la interfase monocapa/hidrocarburo (π_o') y monocapa/agua (π_w') de modo que cuando π_o' es mayor que π_w' la fase externa será la de hidrocarburo y en caso contrario sería la fase acuosa (Figura 2). También señaló que la influencia del alcohol, el cotensioactivo, es doble, pues por una parte aumenta la tensión interfacial gracias a la penetración de las moléculas del alcohol y por otra parte produce una disminución de la tensión interfacial inicial entre el agua y el hidrocarburo.

Más recientemente Rosano (Rosano, H. L. et al. 1987), modificando el concepto de tensión interfacial negativa, señalaron que la difusión de los componentes anfífilos a través de la interfase podría disminuir la tensión interfacial temporalmente hasta cero, provocando la emulsificación espontánea. Sin embargo, consideraron que la tensión interfacial en equilibrio permanecería positiva a diferencia de la opinión sustentada por la escuela de Schulman al considerar esencial la existencia de una tensión interfacial negativa.

También debe destacarse la contribución de Ruckenstein (Ruckenstein, E. 1975), que puso de manifiesto que las microemulsiones podían formarse espontáneamente e irreversiblemente en presencia de una tensión interfacial muy pequeña pero positiva.

2.2. Interpretación en términos de solubilización

A partir de los estudios sobre el comportamiento físico de los compuestos tensioactivos de los que fue pionero Ekwall (Ekwall, P. 1975), se conocían los estados de

agregación de los sistemas formados por tensioactivo iónico, alcohol y agua. Las características de los diagramas ternarios de estos sistemas se muestran en la Figura 3. Friberg (Friberg, S. E. 1977), demostró que se podía solubilizar en soluciones de micelas inversas tales cantidades de hidrocarburo que la composición de solución resultante podía considerarse una microemulsión (L_2). Por otra parte, la misma solución coloidal se podía obtener a partir del hidrocarburo, agregándole el alcohol y a continuación el agua y el tensioactivo iónico, sin que tampoco en este caso se produjese ninguna separación de fases. Estos resultados indujeron a considerar que el alcohol, el tensioactivo iónico y el agua son los componentes que forman la estructura básica de las microemulsiones, siendo éstas visualizadas como modificaciones de dichas estructuras iniciales (soluciones micelares inversas) debido a la presencia del hidrocarburo.

Friberg interpretó que la influencia del hidrocarburo en la solución de micelas inversas era puramente de dilución, quedando la estructura micelar inalterada, por lo que se propuso una identificación de las microemulsiones del tipo A/O con las soluciones de micelas inversas.

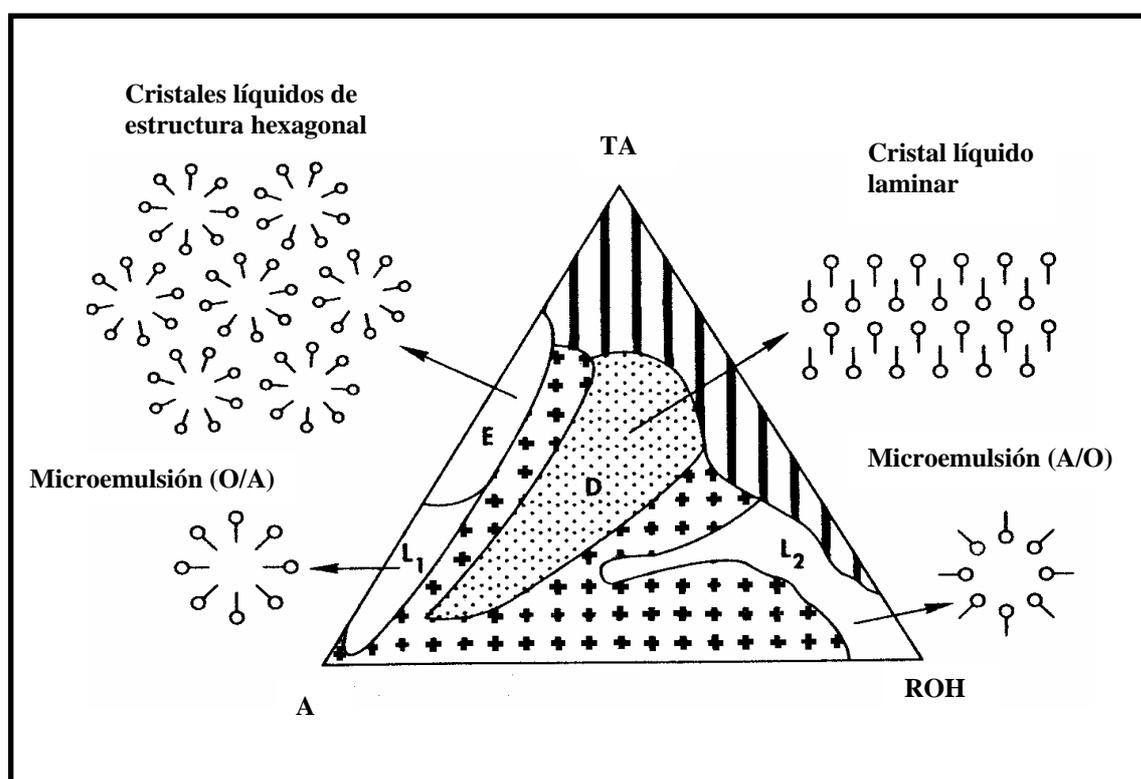


Figura 3. Diagrama esquemático de fases en equilibrio de un sistema ternario agua (A), tensioactivo iónico (TA) y alcohol (ROH), a presión y temperaturas constantes.

De forma análoga se explica la formación de microemulsiones del tipo O/A, aunque la relación entre éstas y las soluciones de micelas normales no es tan directa, pues no forman para algunas relaciones tensioactivo/alcohol.

2.3. Estabilidad termodinámica

Basándose en modelos simplificados se han desarrollado diversas teorías para explicar la estabilidad termodinámica de las microemulsiones. Sin embargo, ninguna de ellas ha resultado completamente satisfactoria. En los primeros tratamientos se consideraba

que la tensión interfacial era el factor dominante en la estabilidad de las microemulsiones. Sin embargo, se comprobó que otros factores juegan un papel igualmente importante. Ruckenstein (Ruckenstein, E. 1975) desarrolló un modelo para explicar la estabilidad termodinámica de las microemulsiones donde se considera la existencia de microgotas monodispersas distribuidas al azar en el seno de una fase líquida. En su tratamiento expresó el cambio de energía libre de formación de una microemulsión, $\Delta G_M(R)$, mediante la contribución de tres términos principales:

$$\Delta G_M(R) = \Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3$$

donde:

ΔG_1 = Incremento de la energía interfacial.

ΔG_2 = Incremento de la energía libre de interacción entre las gotas.

ΔG_3 = Incremento de la entropía en el proceso de dispersión de las gotas de la microemulsión.

La energía libre de interacción entre las gotas, ΔG_2 , depende de un término negativo debido a la atracción de Van der Waals y de un término positivo debido a la repulsión electrostática. Se comprobó que el término debido a las fuerzas de atracción de Van der Waals era insignificante en comparación a los otros términos. En el tratamiento desarrollado por Ruckenstein se puso de manifiesto que la formación espontánea de una microemulsión puede producirse sólo si la tensión interfacial es tan baja que la energía libre de la interfase recién creada pudiera compensarse por la entropía de dispersión de las gotas en el medio.

La estabilización de las microemulsiones requiere que el tensioactivo posea un balance hidrófilo-lipófilo adecuado. Ello puede conseguirse con:

- Un tensioactivo no iónico, como por ejemplo un alcohol graso etoxilado, en un intervalo de temperaturas adecuado.
- Una combinación de un tensioactivo hidrófilo (HLB alto) generalmente de carácter iónico, con un compuesto anfífilo hidrófobo (HLB bajo) denominado cotensioactivo, que es generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia.
- Un tensioactivo iónico de doble cadena hidrófoba, como por ejemplo dioctil sulfosuccinato sódico (AOT).

3. ASPECTOS RELATIVOS A LA FORMULACION

3.1. Formulación con tensioactivos no iónicos

Los tensioactivos no iónicos, por lo general, no necesitan la presencia de un cotensioactivo para formar microemulsiones. Con tales sistemas, la temperatura es el

factor más importante ya que los tensioactivos no iónicos ven incrementada su lipofilia a medida que aumenta la temperatura. Dado que los sistemas agua-aceite solubilizados presenta propiedades similares a bajas concentraciones de tensioactivo, es muy frecuente el uso de diagramas pseudo-binarios de fases en los cuales se representan las fracciones de fase acuosa y oleosa, a un porcentaje en peso fijo del tensioactivo, en función de la temperatura. La Figura 4 representa un diagrama pseudo-binario de fases simplificado.

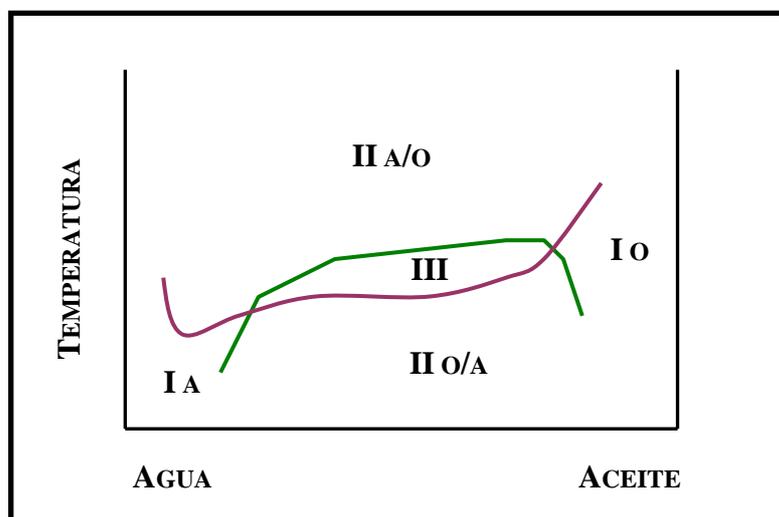


Figura 4. Diagrama de fases pseudo-binario.

Las regiones de fase única isotrópicas con concentraciones altas y bajas de fase acuosa, I_A y I_B , corresponden a microemulsiones O/A y A/O, respectivamente. La región de tres fases intermedia, III, representa un estado de transición entre las fases A/O y O/A; en esta región se localiza la Temperatura de Inversión de Fases (Phase Inversion Temperature o PIT) del sistema, porque a dicha temperatura se produce inversión del signo de la emulsión (Shinoda, K. 1968). En la parte inferior del diagrama encontramos una región de dos fases $I_{O/A}$, compuesta de fase acuosa y oleosa con tensioactivo disuelto. Después de ser mezcladas, suele formarse una macroemulsión O/A. Del mismo modo, la región $II_{A/O}$, a altas temperaturas, representa una región de dos fases compuesta de fase acuosa y oleosa con tensioactivo disuelto que, tras agitación dan lugar a una macroemulsión A/O.

La presencia de sales minerales solubles en agua disminuye la temperatura de inversión de fases de compuestos tensioactivos no iónicos, este efecto es más sensible cuanto mayor es la concentración en sales de las microemulsiones (Mitchell, D. 1981).

El PIT aumenta también ante la presencia de líquidos no polares tales como tensioactivos aniónicos que a menudo se añaden a compuestos no iónicos para mejorar sus propiedades.

3.2. Formulación con tensioactivos iónicos

Para la formulación de microemulsiones inversas del tipo A/O en sistemas con tensioactivos iónicos es de gran utilidad adicionar hidrocarburo a las soluciones de micelas inversas que se forman en los sistemas agua/tensioactivo iónico/alcohol (Figura 3). Las

microemulsiones del tipo directo, O/A, se forman en una estrecha región y sólo para ciertas relaciones de agua/tensioactivo, por lo que su formulación resulta más compleja.

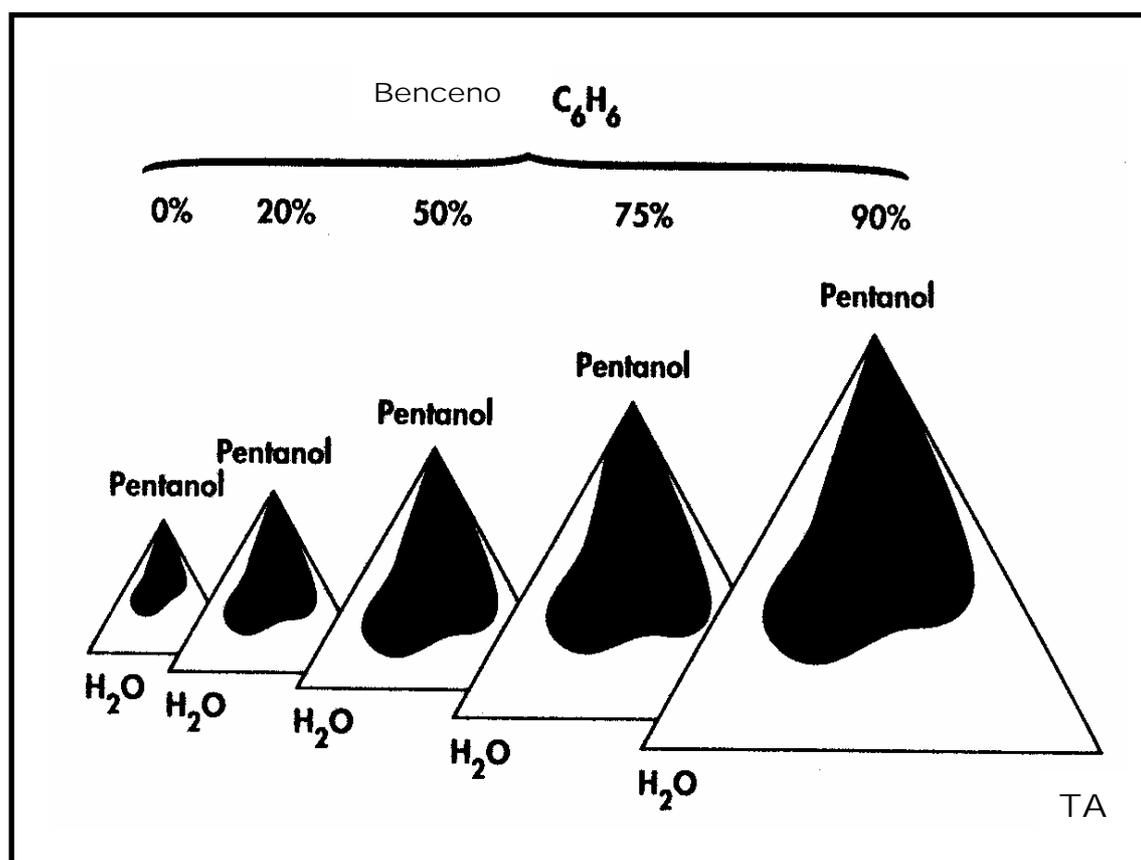


Figura 5. Desarrollo del área de una microemulsión: agua (H_2O), alcohol (pentanol), tensioactivo (TA). Por adición de un hidrocarburo aromático (benceno).

Uno de los factores que intervienen en el desarrollo de la superficie de la microemulsión es la cantidad de hidrocarburo a emulsificar (Figura 5), (Friberg, S. E. 1977).

Las sales minerales solubles intervienen esencialmente sobre las interacciones electrostáticas de las microemulsiones formadas por tensioactivos iónicos, disminuyendo la repulsión entre las gotas de agua, y mejorando las posibilidades de solubilización de la fase orgánica, que se traduce por un aumento del área de existencia de microemulsión en pequeñas cantidades de sales (menos de un 1%), mientras que un exceso reduce la ionización de las moléculas de tensioactivo y, como consecuencia, el área de la microemulsión (Belloca, A. 1980).

3.3 Componentes de las microemulsiones de uso farmacéutico

La correcta formulación de microemulsiones para uso farmacéutico o cosmético exige una selección adecuada de sus componentes, en cuanto a sus características organolépticas (aceptables según la vía de administración a la que estén destinadas las formulaciones), propiedades físico-químicas (pH, viscosidad, punto de fusión, estabilidad

química, naturaleza iónica, etc.) y propiedades biológicas (ausencia de toxicidad y de poder sensibilizante o irritante).

Los componentes de las microemulsiones farmacéuticas pueden agruparse en cuatro categorías:

- Componentes hidrófilos: Agua, propilenglicol, soluciones salinas, polietilenglicol, etc.
- Componentes hidrófobos: Aceites vegetales, ésteres de ácidos grasos, aceites minerales, triglicéridos, etc.
- Tensioactivos: De naturaleza no iónica o iónica (catiónicos, aniónicos o anfóteros).
- Cotensioactivos: Alcoholes, glicoles, derivados de propilenglicol, derivados de poliglicerol, etc.

3.4. Tipos de cosurfactantes empleados para la preparación de microemulsiones de uso farmacéutico

Uno de los mayores problemas encontrados en la preparación de microemulsiones ha sido la elección del tipo de surfactante y/o cosurfactante que estabilice el sistema.

Los cosurfactantes poseen tres funciones esenciales:

1. Permiten obtener tensiones interfaciales muy bajas.
2. Introducen mayores posibilidades sobre las estructuras al actuar sobre la curvatura de la interfase, en función de sus propiedades reológicas y de la relación entre la fuerza del grupo hidrófilo y la importancia de la cadena carbonada, incluyendo su ramificación.
3. Mejoran la fluidez de la película interfacial.

Gran parte de los estudios realizados emplean en la preparación de microemulsiones aminas o alcoholes tóxicos de cadena corta tales como butanol y butilamina, y esto es debido a que la mayoría de los surfactantes no forman microemulsiones sin la presencia de cosurfactantes (Aboofazeli, R., et al. 1993, Aboofazeli, R., et al. 1994, Atwood, D., et al. 1992). Hay notables excepciones como los surfactantes aniónicos de doble cadena di-2-etil-hexilsulfosuccinato sódico (AOT) y dioctadecil dimetil amoniobromico (DDAB) y surfactantes no iónicos de cadena sencilla como los n-alkilpolyoxietileneteres (Brij[®]) (Warisnoichareon, W. et al. 2000).

Además, añadido al problema de toxicidad, la presencia de cosurfactantes en la microemulsión afecta a la estabilidad de las mismas, ya que este tipo de microemulsiones se rompen cuando se diluyen. Esto sucede porque el cosurfactante generalmente se reparte en las tres fases de la microemulsión (región interfacial y la fase acuosa y oleosa). Así que tras una dilución, parte del cosurfactante pasa de la región interfacial a la fase continua para restablecer el equilibrio y por lo tanto se destruye la integridad de la microemulsión. La supresión del uso de cosurfactantes en la formulación de microemulsiones supondría una gran ventaja para el uso farmacéutico.

Otro serio problema desde el punto de vista de la formulación es que la mayoría de los trabajos de investigación han realizado hasta ahora estudios de formación de microemulsiones usando aceites aromáticos y alifáticos tales como hexano y benceno, los cuales no son apropiados para formulaciones farmacéuticas (Atwood, D. et al. 1983, Malcolmson, C. et al. 1998).

Recientemente y debido al gran interés que presentan estos sistemas como potenciales vehículos de liberación de fármacos, un gran número de estudios han sido publicados en los que se usan surfactantes iónicos menos tóxicos y el surfactante biocompatible lecitina (Trotta, M. et al. 1995, Trotta, M. 1999, Gasco, M. R. et al. 1991, Aboofazeli, R. et al. 1993, Aboofazeli, R. et al. 1994, Atwood, D. et al. 1992, Shinoda, K. et al. 1991).

El uso de surfactantes no iónicos tales como los n-alkilpolyoxietilen eteres son particularmente atractivos porque es posible formar microemulsiones sin la necesidad de un cosurfactante. Además su uso está aumentando considerablemente debido a su baja irritabilidad y a su elevada estabilidad química. También es posible crear microemulsiones acuo-oleosas en un limitado rango de concentraciones con lecitina sola, sin embargo se requiere la presencia de un cosurfactante con el fin de producir microemulsiones en un área mayor.

Para tratar de evitar el uso de alcoholes o aminas tóxicas como cosurfactantes, algunos investigadores han recurrido al uso de alcoholes polihídricos aceptados farmacéuticamente, tales como sorbitol (Ktistis, G. 1990). Aunque estos compuestos se consideran cosurfactantes, no realizan su función en la capa interfacial, sino que actúan disminuyendo el balance hidrófilo-lipófilo del surfactante, mediante la reducción de la solubilidad de los grupos polares de la fase acuosa (Eicke, H. F. 1979). Desafortunadamente, a pesar de que estos cosurfactantes no son tóxicos, las microemulsiones que los contienen no son diluibles.

Otro tipo de tensioactivos empleados en la formulación de microemulsiones para uso farmacéutico son los tensioactivos formados por un azúcar y los tensioactivos fluorinados. Los tensioactivos formados por un azúcar tienen un gran número de aplicaciones farmacéuticas debido a su baja toxicidad, a su biocompatibilidad y a su excelente biodegradabilidad, además ofrecen una alternativa muy atractiva al uso de tensioactivos etilenoxidados no iónicos, debido a su menor influencia por la temperatura. Un ejemplo de este tipo de tensioactivos son los ésteres de sucrosa cuyas propiedades lipofílicas e hidrofílicas pueden ser reguladas por la variación de la longitud de cadena de los ácidos grasos que lo componen (Garti, N. et al. 1999).

Los tensioactivos fluorinados se caracterizan por presentar uniones intramoleculares muy fuertes y por el contrario, interacciones intermoleculares muy débiles. Poseen excepcionales características térmicas, químicas e inercia biológica, baja tensión superficial, alta fluidez, poca solubilidad en agua y alta capacidad de disolución de gases. Por todas estas características, estos compuestos son candidatos excepcionales para producir sustitutos de la sangre y otros fluidos biocompatibles (LoNostro, P. et al. 1999).

Para un uso farmacéutico, no importando que tipo de microemulsión se requiera, sólo los surfactantes no iónicos o *zwiterónicos* deberían ser considerados como los menos tóxicos, los menos afectados por el pH, o por la presencia de sales, etc... (Attwood, D. et al. 1983).

En la Tabla 4 y como resumen de este capítulo, aparecen reflejadas las consideraciones necesarias cuando se formulan microemulsiones. Si todas ellas se tienen en cuenta durante la formulación, las microemulsiones pueden considerarse vehículos potenciales de la liberación de fármacos.

Componentes	Posibles consecuencias
Aceites polares	Pueden impedir la formación de microemulsiones
Aceites de bajo peso molecular	Pueden alterar la solubilización del fármaco en la región interfacial
Cosurfactantes	Las microemulsiones que los contienen pueden no ser diluibles
Surfactantes de cadena alquílica larga	Pueden no formar microemulsiones en un intervalo de temperaturas apropiado
Fármacos con propiedades tensioactivas	Pueden alterar el área de existencia y causar cambios de fase tras su liberación
Presencia de electrolitos, tampones u otros aditivos	Pueden afectar a la estabilidad y alterar el área de formación de las microemulsiones

Tabla 4. Algunos problemas que pueden derivarse del uso de determinados componentes en la formulación de microemulsiones.

4. ESTRUCTURA Y TECNICAS DE CARACTERIZACION

4.1. Estructura

Como resultado de las investigaciones que se han realizado en los últimos años, se puede afirmar que las microemulsiones no se ajustan a un solo modelo estructural. Las estructuras más conocidas de las microemulsiones son las basadas en microgotas esféricas de tamaño uniforme de una de las fases en el seno de la otra.

En la Figura 6 pueden observarse dos estructuras opuestas. En la de tipo directo (O/A), las moléculas de tensioactivo se sitúan con la cadena hidrófoba hacia el interior, lo cual crea un medio interno apolar que permite la solubilización de compuestos lipófilos. En las de tipo inverso (A/O) las cabezas polares se dirigen hacia el interior de la estructura formándose un medio polar que favorece la solubilización de agua o compuestos hidrófilos en su interior. Además de estas dos estructuras se han propuesto un gran número de estructuras bicontinuas o en forma de esponja, las cuales no han sido totalmente identificadas. Entre las diversas estructuras bicontinuas propuestas destacan el modelo de Scriven, relacionado con estructuras de tipo cúbico; el de Shinoda, relacionado con la estructura laminar; el de Talmon y Prager, basado en el modelo de "Voronoi", etc.

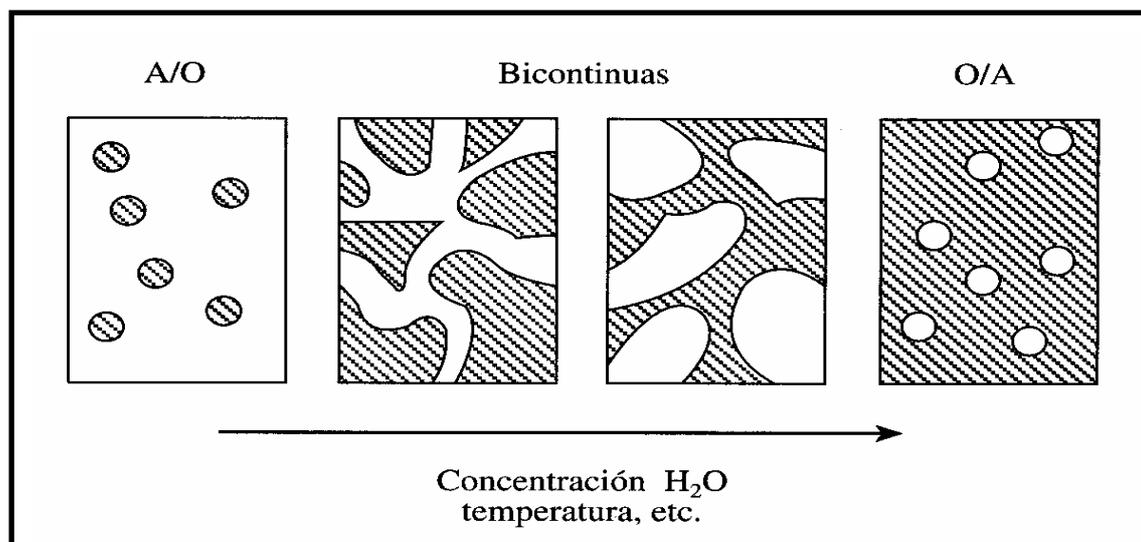


Figura 6. Transiciones estructurales desde microemulsiones inversas (A/O) a microemulsiones directas (O/A) a través de microemulsiones bicontinuas.

Al aumentar la concentración de agua o bien la temperatura, se produce una transición de las microemulsiones inversas (A/O) a microemulsiones directas (O/A), pasando por una serie de estructuras bicontinuas que pueden presentar birrefringencia.

4.2. Técnicas de caracterización

La caracterización de la estructura de las microemulsiones se realiza mediante diversas técnicas experimentales. En las microemulsiones que presentan estructuras de tipo directo (O/ A) o inverso (A/O) se caracteriza el tamaño y forma de las microgotas así como las interacciones entre ellas. En las bicontinuas existen diversos parámetros para su caracterización como, por ejemplo, la distancia promedio máxima entre dos dominios acuosos o lipófilos. Asimismo, es importante estudiar la influencia de diversos parámetros, tales como la estructura de las moléculas de tensioactivo o del componente lipófilo, la temperatura, composición y la naturaleza de aditivos (como, por ejemplo, alcoholes, electrólitos, etc...). No obstante, dada la complejidad de estos sistemas, los resultados obtenidos a partir de una sola técnica, generalmente no son suficientes para caracterizar de un modo inequívoco un sistema en microemulsión. Por ello generalmente es necesaria la comprobación o el apoyo de varias técnicas. Para caracterizar microemulsiones son destacables las siguientes:

4.2.1. Diagramas de fases: Son indispensables en el estudio de las microemulsiones. Los límites de las zonas de una fase se pueden obtener mediante la observación directa de mezclas de composición conocida. La información obtenida puede complementarse con la observación microscópica con luz polarizada que permite diferenciar las fases anisótropas de las isotrópicas.

4.2.2. Determinaciones de tensiones interfaciales: Son necesarias, ya que este parámetro es uno de los factores principales en la estabilidad de las microemulsiones. Para formar estas dispersiones coloidales es indispensable que se produzca una disminución considerable de la tensión interfacial entre la fase acuosa y la fase oleosa del orden de 10^{-3} mN/m. Para determinar estos valores extraordinariamente bajos de tensión interfacial se

requieren técnicas experimentales muy específicas. En este sentido la técnica más adecuada es la de la gota giratoria (Spinning drop).

4.2.3. Técnicas de difusión: Dichas técnicas incluyen la difusión estática y dinámica de la luz, difusión de rayos X a ángulo pequeño y difusión de neutrones. Estas técnicas de difusión no sólo proporcionan la información estructural de la microemulsión, sino que también permiten determinar las interacciones entre las gotas, que pueden influir en la estructura y propiedades de las microemulsiones. Sin embargo, estas técnicas tienen algunas limitaciones, puesto que para la interpretación de los resultados se requiere el ajuste a un modelo teórico. Asimismo, en algunas de ellas es necesario diluir la muestra con el fin de reducir las interacciones entre las partículas.

4.2.4. Viscosidad: Las medidas reológicas permiten deducir la forma de los agregados, pues si son esféricos muestran mayor resistencia a fluir.

La reología estudia las propiedades de flujo que adquiere un sistema tras someterlo a la acción de una fuerza de cizalla. El distinto comportamiento ante esa fuerza de deformación, permite clasificar los fluidos en Newtonianos y no-Newtonianos (García, S. et al 1995).

Una relación lineal entre la fuerza de cizalla y la velocidad de deformación, permite definir un fluido Newtoniano como aquél en el que la viscosidad es constante. La no-linealidad aporta carácter no-newtoniano. A su vez, los fluidos no-newtonianos pueden dividirse en: pseudoplásticos, plásticos y dilatantes.

Un aumento en la fuerza de cizalla supone una disminución de la viscosidad en un fluido pseudoplástico, a diferencia del aumento de viscosidad que caracteriza a un fluido dilatante. En caso de un fluido plástico, es necesario aplicar una tensión de empuje mínima a fin de provocar el flujo. Ese valor de ruptura, se conoce como umbral de flujo. Un cuerpo plástico puede comportarse como un fluido Bingham o Casson, según sea constante o no la relación entre la velocidad de deformación y la fuerza aplicada a partir del punto de ruptura.

La tixotropía permite estudiar en los fluidos su mayor o menor capacidad de regeneración tras sufrir el efecto de una fuerza de cizalla, consecuencia de la cual la red molecular se destruye y necesita más o menos tiempo para reconstruirse. El reograma de este tipo de fluidos muestra una curva de histéresis, donde puede observarse que ante una misma intensidad de fuerza la rama descendente muestra mayor gradiente de velocidad, debido a que el sistema no ha podido recuperarse completamente y ofrece menor viscosidad.

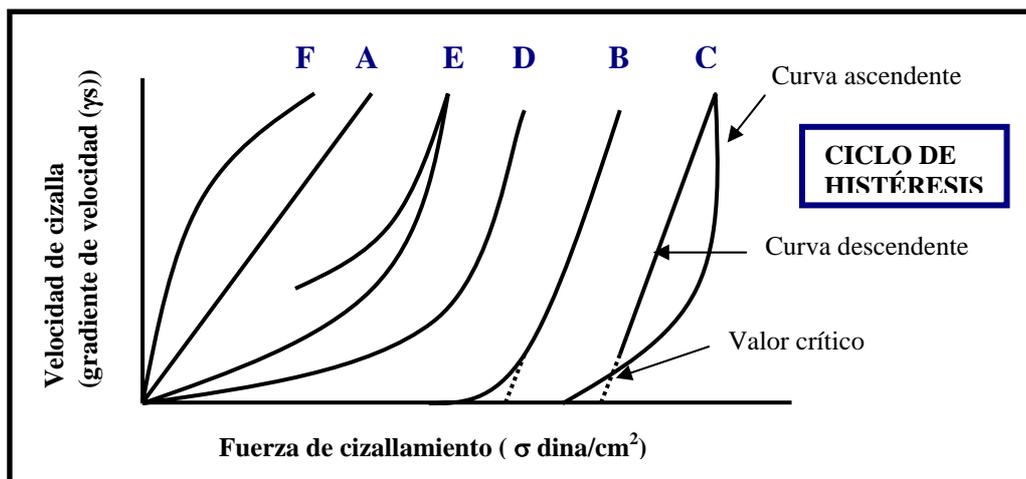


Figura 7. Curvas de flujo características. A, líquido Newtoniano. B, sustancia Bingham. C, sustancia Bingham con tixotropía. D, material pseudoplástico. E, pseudoplástico con tixotropía. F, sustancia dilatante.

El fenómeno contrario se conoce como reopexia, se trata de un aumento reversible de la viscosidad del sistema al someterlo a una fuerza de cizalla. En la Figura 7 aparecen reflejados los distintos tipos de flujo existentes.

En la siguiente tabla se encuentran recogidas las ecuaciones para determinar la viscosidad (μ) cuya unidad en el SI es el Pascal-segundo y sus unidades son $N \cdot s/m^2$ o $Kg/m \cdot s$, y en el CGS la unidad es el Poise.

Modelo	Newtoniano	Plástico (Bingham)	Pseudoplástico (Ostwald)*	Dilatante
Ecuación	$\mu = \sigma / \gamma$	$\sigma = \sigma_0 + \mu \gamma$	$\mu = k \gamma^{(n-1)}$ $n > 1$	$\gamma = k \sigma^n$ $n < 1$

* k y n son los índices de consistencia y flujo respectivamente; γ es la velocidad de cizalla y σ es la tensión de cizalla.

Tabla 5. Ecuaciones para la determinación de la viscosidad.

4.2.5. Conductividad eléctrica: De modo similar a las emulsiones, a las microemulsiones de tipo directo (O/A) les corresponde una elevada conductividad, mientras que la conductividad de las microemulsiones de tipo inverso (A/O) es baja. No obstante, al diluir las microemulsiones (A/O) pueden mostrar un aumento pronunciado de conductividad, indicativo del intercambio de iones entre las gotas, que es el llamado "fenómeno de percolación".

4.2.6. Resonancia nuclear magnética (NMR): Mediante medidas del coeficiente de autodifusión se obtiene información del estado o localización de las moléculas en una microemulsión y de la existencia de estructuras de tipo directo, inverso o bicontinuas o de interfaces deformables y flexibles con un tiempo corto de vida media.

4.2.7. Técnicas para determinar el tamaño de gotícula: La amplia variedad de tamaños de las gotas de microemulsión, así como la imposibilidad de diluirse en algunos casos hasta diluciones infinitas, hace muy difícil la medición precisa del tamaño de gotícula. Generalmente en los sistemas de medida del tamaño de gotícula se utilizan concentraciones muy bajas con el fin de disminuir las interacciones entre las partículas, no siendo muy correcto este proceso en el caso de las microemulsiones, puesto que no es posible diluir estos sistemas sin afectar a su estructura. Es por ello que existe una gran variedad de técnicas que han empleado diversos autores, teniendo en cuenta cada una de ellas sus limitaciones (Swarbrick, J. et al. 1994). Las técnicas más comunes son:

- Microscopía electrónica. En principio es posible medir el tamaño de las gotas utilizando microscopía de transmisión electrónica (TEM). Muchos autores han publicado los resultados obtenidos utilizando la microscopía electrónica con criofractura. (FFEM).
- Métodos de barrido. Los métodos que se han utilizado hasta ahora en el estudio de microemulsiones son *small angle x-ray scattering (SAXS)*, *small angle neutron scattering (SANS)*, *dynamic, static, photon, o electrophoretic light scattering (DLS, SLS, PLS, ELS)*.

De todos ellos el más utilizado en el campo farmacéutico es la *espectroscopía de correlación fotónica*, también llamado *dynamic light scattering (DLS)*. La espectroscopía de correlación fotónica analiza las fluctuaciones en la intensidad de barrido que ocurre en intervalos de tiempo muy cortos debidos al movimiento Browniano de las partículas.

4.2.8. Test de centrifugación. Se realiza a elevada velocidad y durante un tiempo más o menos largo, y se observa si se ha producido una separación de fases.

4.2.9. Ciclos de congelación-descongelación. La elevada estabilidad de una microemulsión se comprueba cuando tras someterla a sucesivos ciclos de congelación-descongelación se recupera la estructura original.

Además de estas técnicas, también son de interés para conocer la estructura de las microemulsiones las siguientes: pH, métodos de fluorescencia dinámica y estática, (*time-resolved fluorescence quenching, TRFQ*) birrefringencia eléctrica, videomicroscopía (VEM), estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC), etc.

5. APLICACIONES FARMACEUTICAS DE LAS MICROEMULSIONES

5.1. Introducción

Las investigaciones realizadas en los últimos años han permitido desarrollar formulaciones adecuadas para la administración de fármacos, principalmente por vía tópica (acción local y acción sistémica), por vía oral y por vía parenteral (Tabla 6). También en el ámbito cosmético las microemulsiones han suscitado un gran interés para el desarrollo de nuevos preparados.

Principio activo	Vía de administración	Signo de microemulsión	Referencia
α-Tocoferilacetato	Transdérmica	O/A y A/O	Rangarajan, M. et al. 2001
.Prostaglandina E	Transdérmica	O/A	Ho, H. et al. 1998
8-Metoxalen y Fucomarinas	Transdérmica	O/A y A/O	Baroli, B. et al. 2000
Bupranolol y Timolol	Transdérmica	O/A y A/O	Kemken, J. et al. 1991
Diclofenaco	Transdérmica	O/A	Kriwet, K. 1995
Difenhidramina clorhidrato	Transdérmica	A/O	Schmalfuß, U. et al. 1997
Doxorrubicina	Transdérmica	O/A y A/O	Gasco, M. R. et al. 1988
Felodipino	Transdérmica	O/A	Trotta, M. et al 1997
Hematoporfirina	Transdérmica	A/O	Trotta, M. et al 1994
Hidrocortisona	Transdérmica	O/A y A/O	Lehmann, L. et al. 2001
Lidocaína y prilocaína	Transdérmica	O/A y A/O	Kreilgaard, M. 2001
Metotrexato	Transdérmica	O/A y A/O	Álvarez-Figueroa M. J. 2001
Nortriptilina clorhidrato	Transdérmica	O/A	Moreno, M. et al. 2000
Piroxicam	Transdérmica	O/A y A/O	Dalmora, M. E. et al. 2001
Prednisona	Transdérmica	O/A	Gasco, M. R. et al. 1988
Propanolol	Transdérmica	O/A	Ktistis, G. et al. 1998
Testosterona y Progesterona	Transdérmica	O/A	Malcolmson, C. et al. 1993
Tetracaína	Transdérmica	O/A	García, M. J. 1998
Tetracaína clorhidrato	Transdérmica	A/O	Changez, M. et al. 2000
Bifenil dimetil dicarboxilato	Oral	O/A	Kim, C. K. et al. 2001
Calcitonina y el péptido RGD	Oral	A/O	Constantinides, P. P. et al. 1995
Ciclosporina A	Oral	O/A	Holt, D. W. et al. 1994
Diazepam	Oral	O/A	Trotta, M. et al. 1990
Flurbiprofeno	Oral	SMEDDS	Park, K. M. et al 1999
Halofantrine	Oral	SMEDDS	Khoo, S. M. et al. 1998
Hormona del crecimiento	Oral	A/O	Cho, Y. W. 1992
Idebenona	Oral	SMEDDS	Kim H. J. et al. 2000
Indometacina	Oral	SMEDDS	Farah, N. et al. 1994
Insulina	Oral	O/A	Gasco, M. R. et al. 1992
Insulina	Oral	O/A	Ho, H. et al. 1996
Levobunolol	Oral	O/A	Gallarate, M. et al. 1993
Péptidos	Oral	A/O	Owen, A. J. et al. 1992
Vasopresina	Oral	A/O	Ritschel, W. A. 1993

Tabla 6. Principales principios activos formulados en microemulsiones.

Principio activo	Vía de administración	Signo de microemulsión	Referencia
Anfotericina B	i.v.	O/A	Moreno, M. et al. 2001
Felodipino	i.v.	O/A	von Corswant, C. V. et al. 1998
Flurbiprofen	i.v.	O/A	Park, K. M. et al. 1999
Indometacina	i.v.	O/A	Trotta M. 1999
Testosterona propionato	i.v.	O/A	Malcolmson, C. et al. 1997
Pilocarpina	Ocular	O/A	Hasse, A. et al. 1997
Timolol	Ocular	O/A	Gasco, M. R. et al. 1989
Retinol	Ocular	O/A	Radomska, A. et al. 2000
Clonixinato de lisina	i.m.	A/O	Pineros, I. 2000
Bromo-metoxi-zidovudina	Vaginal	A/O	D'Cruz O. J. et al. 2001
Fármacos polares	Nasal	O/A	Sommerville, M. L. et al. 2000
Vacunas	Nasal	O/A	O'Hagan, D. T. 1998

Tabla 6. (Continuación) Principales principios activos formulados en microemulsiones.

Las aplicaciones farmacéuticas y cosméticas de las microemulsiones derivan directamente de sus propiedades.

Por su elevada capacidad de solubilización, las microemulsiones permiten solubilizar principios activos y excipientes hidrosolubles en un medio lipófilo, compuestos liposolubles en medio hidrófilo, así como ambos tipos de compuestos (hidrosolubles y liposolubles) conjuntamente en una misma formulación transparente sin separación de fases. Debido a las características estructurales de las microemulsiones es posible solubilizar compuestos químicamente incompatibles sin que se produzca interacción entre ellos.

La capacidad de solubilización de las microemulsiones, la estabilidad termodinámica, el pequeño tamaño de sus agregados, la transparencia, la fluidez y la extensibilidad son propiedades esenciales para la formulación de preparados cosméticos y dermofarmacéuticos.

5.2. Administración transdérmica de microemulsiones

Se han realizado un gran número de estudios en el que se han diseñado formulaciones en forma de microemulsión para la administración transdérmica de fármacos (Ho, H. et al. 1998). Se han evaluado microemulsiones tanto O/A como A/O para la liberación de prostaglandina E1 cuyos componentes son ácido oleico como fase oleosa, estabilizada por una mezcla de Labrasol y Plurol oleico CC 497 como tensioactivos.

También se han diseñado microemulsiones para la liberación transdérmica de indometacina y diclofenaco compuestas por lecitina, IPP y agua (Dreher, F. et al. 1997) y se ha podido comprobar que favorecen la penetración cutánea de diversos principios

activos (lidocaína, tocoferol, etc.) (Kreilgaard, M. 2001, Rangarajan, M. et al. 2001), en comparación con otras formas farmacéuticas como las emulsiones, geles o soluciones de aplicación tópica. Igualmente se ha demostrado que pueden actuar como reservorio logrando la liberación prolongada de algunos fármacos (propranolol, doxorubicina, prednisona, etc.). (Ktistis, G. et al. 1998, Gasco, M. R. et al. 1988, Gasco, M. R. et al. 1988).

La mayoría de los estudios que se han publicado sobre las microemulsiones se basan en su aplicación en el campo dermatológico, debido a la amplia variedad de excipientes potenciales. Se utilizan los surfactantes menos irritantes y se formulan a las menores concentraciones. Un factor adicional a considerar es la seguridad de la formulación, porque concentraciones elevadas de surfactantes (1-25%), cosurfactantes, o cosolventes (5-10%), promueven la penetración a través de la piel de otros componentes, no sólo terapéuticos sino también irritantes y carcinogénicos. También la viscosidad de la microemulsión y el volumen de la fase dispersa son factores a tener en cuenta a la hora de formular microemulsiones para la administración transdérmica de fármacos (Trotta, M. et al. 1990).

Se han realizado estudios con el fin de conocer como afectan cada uno de los excipientes de la formulación a la penetración del mismo a través de la piel, es el caso del fármaco felodipino que ha sido formulado en forma de microemulsión O/A constituida por Tween 20, taurodeoxicolato, IPM y alcohol bencílico, y formulaciones de lidocaína en forma de microemulsión constituida por lecitina, alcanol, dodecano, y agua (Trotta, M. et al. 1997, Choi, S. Y. et al. 1999).

Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se han combinado diversas estrategias para la liberación de fármacos, como es el caso de piroxicam con β -ciclodextrinas formulado en microemulsiones O/A. Estas microemulsiones están constituidas por IPM y el tensioactivo catiónico hexadeciltrimetilamonio (Dalmora, M. E. A. et al. 2001). En un estudio similar, esta vez empleando un tensioactivo aniónico, se demostró que la permeabilidad del trinitrato de glicerina se elevaba 10 veces si se formulaba en micelas de AOT, en micelas inversas y en microemulsiones A/O.

Una aplicación muy interesante de las microemulsiones son los organogeles constituidos por microemulsiones de gelatina (MBGs) que contienen canales acuosos que permiten el paso de sustancias hidrofílicas mediante la iontoforesis (Kantaria, S. et al. 1999). Los MBGs se preparan con una gran variedad de tensioactivos y aceites como IPM y Tween 80 (Figura 8). También han surgido nuevos organogeles de monoestearato de sorbitan para el transporte transdérmico de ciertos fármacos y antígenos (Murdan, S. et al. 1999).

Una ventaja terapéutica de la administración transdérmica de fármacos en forma de microemulsiones, es el poder facilitar el paso a través de la piel de fármacos de difícil penetración percutánea, como son los fármacos hidrofílicos, por ejemplo el clorhidrato de difenhidramina. Esta microemulsión contiene Tween 80 y Span 20 junto con IPM. También se incluyó en la formulación colesterol y se vio que favorecía la penetración del fármaco y ácido oleico que no ejercía ningún efecto. Las microemulsiones facilitan el transporte de estos compuestos alterando las propiedades de la barrera lipídica del estrato córneo incrementando su penetración (Schmalfuß, U. et al. 1997).

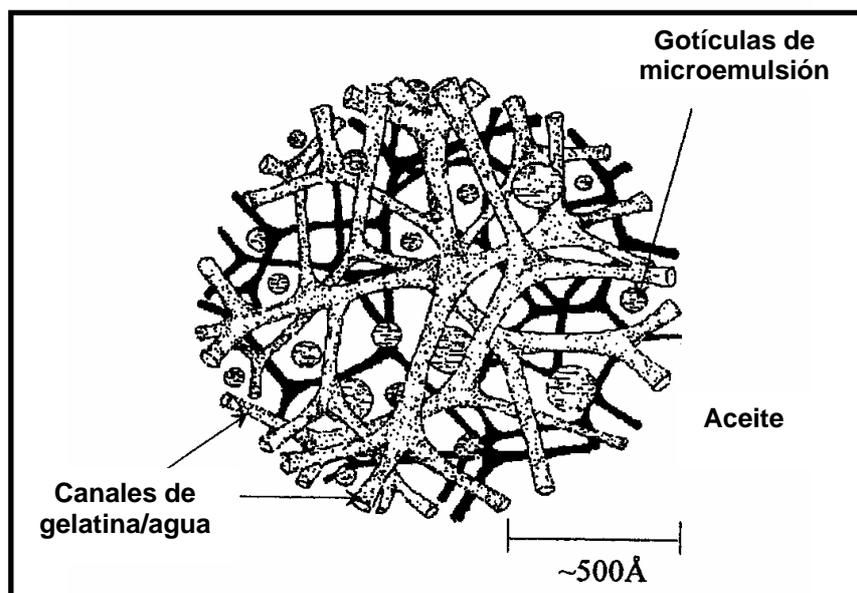


Figura 8. Estructura de un MBG según Atkinson, P. J. et al. 1991.

5.3. Administración parenteral, pulmonar y ocular de microemulsiones

Las microemulsiones inyectables, además de las ventajas derivadas de la capacidad de solubilización, presentan unas características especiales como consecuencia del pequeño tamaño de sus agregados. Se pueden someter a filtración esterilizante sin que experimenten ninguna modificación. Asimismo, permiten administrar lípidos por vía intravenosa como fuente de calorías, lo cual solamente se podía lograr mediante la formulación de emulsiones de pequeño tamaño de gota, con los problemas derivados de la inestabilidad termodinámica de las mismas. También cabe destacar las investigaciones realizadas con microemulsiones formuladas con componentes fluorados capaces de solubilizar oxígeno, como potenciales sustitutos de la sangre.

Las microemulsiones tienen un elevado potencial como vehículos en la administración parenteral de principios activos, a causa de su elevada capacidad solubilizadora. Sin embargo, su utilización por vía intravenosa requiere cumplir unos rigurosos requisitos de ausencia de toxicidad de la formulación. Por este motivo, hasta ahora no hay casi publicaciones acerca del uso de microemulsiones por la vía intravenosa. Algunos estudios han mostrado que las microemulsiones pueden formularse incorporando triglicéridos de cadena media como componente no polar y fosfatidilcolina y alcoholes de cadena corta (C₃-C₄), como surfactante y cosurfactante respectivamente (Von Corswant, C. et al 1998, Aboofazeli, R. et al 1994). Los alcoholes de cadena C₃-C₄ no son aceptables para su utilización por vía intravenosa, pero, los triglicéridos de cadena media y la fosfatidilcolina son utilizados en emulsiones nutricionales (Davis, S. et al 1983).

Uno de los estudios más recientes de sistemas de liberación de fármacos para uso parenteral ha sido la preparación y evaluación de microemulsiones O/A de flurbiprofeno. Los sistemas se prepararon utilizando como fase oleosa etil oleato y Tween 20 como tensioactivo. La solubilidad del fármaco fue 8 veces mayor que en la solución tampón, pero no se observaron diferencias significativas en el comportamiento farmacocinético después de su administración a ratas (Park, K. M. et al. 1999). Así mismo se han realizado

estudios "in vivo" para ver la respuesta hemodinámica producida por microemulsiones formuladas y caracterizadas para la administración por vía endovenosa. Las microemulsiones están formadas por Miglyol 810N (MCT), fosfatidilcolina (Epicuron 200), PEG 400, polietilen glicol (660)-12-hidroestearato y etanol. Se demostró que dichos sistemas poseen una estructura bicontinua que tras diluirse pasa a formar una emulsión O/A. Se realizaron estudios de solubilización en las microemulsiones de felodipino y el antioxidante H 290/58 pero los estudios "in vivo" sólo se realizaron con los sistemas libres de fármaco (Von Corswant, C. et al. 1998).

Se han desarrollado formulaciones para la administración pulmonar de fármacos en microemulsiones de agua en el propelente HFA estabilizadas por un tensioactivo fluorocarbonado no iónico. En estos estudios se demuestra la formación de microemulsiones aunque no se han incluido datos en los que se haya incorporado algún fármaco a dichos sistemas (Patel, N. et al. 1998).

También se han realizado estudios de desarrollo y caracterización de microemulsiones O/A para la liberación ocular de fármacos. Las microemulsiones contienen como principio activo pilocarpina y como cosurfactantes lecitina, propilenglicol y PEG 200, y como fase oleosa IPM. Estas formulaciones de baja viscosidad han demostrado no ser irritantes en ojos de conejos, y se observó un prolongado efecto farmacológico en comparación con la administración del fármaco en solución acuosa. Esto puede ser debido a un incremento de la biodisponibilidad o a un aumento de la retención del fármaco, o a ambos (Hasse, A. et al. 1997).

5.4. Administración oral de microemulsiones

Se ha investigado la utilización de microemulsiones para favorecer la estabilidad y mejorar la absorción y la biodisponibilidad de péptidos (insulina, vasopresina, ciclosporina) y proteínas desde el tracto gastrointestinal, por vía peroral, intraluminal y rectal. (Ritschel, W. A. 1993, Constantinides, P. P. 1995).

El uso de microemulsiones O/A, para la liberación oral de principios activos se ha centrado en la liberación de péptidos lipofílicos, particularmente de ciclosporina. Existen dos formas de dosificación comercializadas de ciclosporina, denominadas Sandimmune, una de ellas es una solución con aceite de oliva que también contiene etanol y Labrafil M 1944 Cs, y la otra son cápsulas blandas de gelatina que contiene, aceite de maíz, gelatina, glicerol, etanol deshidratado y Labrafil M 2125 CS. A partir de estas formulaciones, sin embargo, la magnitud y velocidad de absorción del principio activo varía de forma intra e interindividual, presentando una biodisponibilidad oral entre el 7-90%. Por ello ha sido necesario desarrollar una formulación efectiva de ciclosporina con unas características de absorción más repetibles, de manera que muchos investigadores están estudiando esta posibilidad utilizando diferentes sistemas de microemulsiones.

En un estudio sistemático, Ritschel (1993) publicó la absorción gastrointestinal de ciclosporina A utilizando sistemas de microemulsiones O/A. En la actualidad existe una nueva formulación de ciclosporina A (Sandimmune Neoral) desarrollada recientemente por Sandoz (Holt, D.W. et al 1994). Esta nueva formulación es una microemulsión preconcentrada similar a los SEDDS (self-emulsifying drug delivery systems) puesto que forma una microemulsión O/A tras una autoemulsificación *in vivo*, y que contienen la ciclosporina A, con un surfactante, un cosolvente hidrofílico y una mezcla de solventes hidrofílicos y lipofílicos. En estudios clínicos esta formulación presenta menores

variabilidades inter e intraindividuales comparada con el Sandimmune original. En un estudio relacionado se preparó una formulación para la liberación de ciclosporina A en forma de microemulsión O/A que contenía Cremophor EL[®] como tensioactivo, Transcutol[®] como cosurfactante y Captex 355[®] como la fase oleosa. La biodisponibilidad de esta nueva formulación superó en 3,3 y 1,25 a las que poseen las formulaciones de Sandimmune[®] y Sandimmune Neoral[®] respectivamente (Gao, Z. G. et al. 1998).

Un estudio farmacocinético con la formulación en forma de microemulsión Sandimmune ciclosporina A Neoral permitió comprobar las mejoras respecto a la biodisponibilidad producidas por dicho fármaco debido a una reducida variabilidad intra e inter paciente y también demostró su efectividad frente al tratamiento de la psoriasis (Erkko, P. et al. 1997). Muy recientemente se han realizado ensayos farmacocinéticos de formulaciones en forma de microemulsión para la administración oral de Neoral[®] y un macrólido inmunodepresor denominado SDZ RAD. Estos estudios se han realizados en primates y parece que presentan unos resultados de eficacia y tolerancia muy esperanzadores (Hausen, B. et al. 2000). También se han realizado estudios de formulaciones orales de SEDDS libres o incluidos en cápsulas de gelatina para la administración oral de valsopdar, un análogo de la ciclosporina frente a la infusión intravenosa del fármaco. (Muller, E. A. et al. 1997). El antimalárico halofantrine también se ha formulado en forma de SEDDS y SMEDDS y se comprobó que la biodisponibilidad de estas formulaciones superaba en 6 y 8 veces la de los comprimidos (Khoo, S. M. et al. 1998).

Se han estudiado también nuevas formulaciones de SMEDDS conteniendo flurbiprofeno. Estas formulaciones estaban constituidas por etiloleato, etanol y fosfolípidos y presentaron diferencias ventajosas frente a las formulaciones ya comercializadas en forma de soluciones (Park, K. M. et al. 1999). Así mismo en otro estudio realizado se prepararon microemulsiones O/A de indometacina constituidas por IPM, lecitina, isolecitina y etanol (Ktistis, G. 1997).

Las microemulsiones A/O han sido racionalmente utilizadas para servir de barreras físicas y metabólicas a moléculas solubles en agua, particularmente péptidos y proteínas. La formulación de microemulsiones A/O para ser usadas como SEDDS o SMEDDS se ha investigado usando tensioactivos tanto de bajo como de alto HLB, generalmente ésteres de sorbitan y Tween 80. La fase oleosa incluía cadenas de longitud larga o media de glicéridos (Constantinides, P. P. et al. 1997).

Recientes publicaciones describen microemulsiones autoemulsificables (SMEDDS), utilizadas para la liberación de péptidos ya que no requieren elevadas temperaturas para su preparación. Ritschel y colaboradores formularon vasopresina en microemulsiones A/O, y se vio que aumentaba su absorción en el intestino delgado mucho más que si se formula en una solución acuosa. También se han utilizado las microemulsiones A/O para incorporar calcitonina, utilizando glicéridos de cadena media (Owen, A. J. 1992), los cuales mejoran la estabilidad de las proteínas a temperatura ambiente y mejoran significativamente la absorción oral y rectal de calcitonina. Ho, H., y colaboradores (1996), prepararon microemulsiones de fase externa oleosa que contienen insulina para la administración oral. Utilizaron ácidos grasos de poliglicerol como surfactantes no-iónicos y alcoholes de cadena corta como cosurfactante. De los resultados del test de estabilidad, medidas de viscosidad y la demostración de efectividad "in vitro" en la protección de la insulina de los ácidos del estómago, se puede decir que la microemulsión podría utilizarse en el

tratamiento de la diabetes, si el test "in vivo" confirmase la eficacia oral de esta formulación.

Constantinides, P.P. y colaboradores (1994), elaboraron una microemulsión, estable, libre de alcoholes, con glicéridos de cadena media (Capmul MCM). Incorporaron principios activos solubles en agua, que tenían diferentes características físico-químicas (Calcitonina, SK&F 106760). Evidenciaron que no se producían daños tisulares macroscópicos durante 4-6 horas después de administrarse las microemulsiones con una dosis de 3,3 ml/kg de peso. Se vio que las actividades farmacológicas de los principios activos no se vieron comprometidas en ningún momento. Los mismos autores en un trabajo posterior (1995), demostraron que microemulsiones A/O de diferente composición y tamaño de partícula pueden mejorar la absorción del péptido SK&F 106760 en ratas desde un 0,5% a partir de una solución salina a más de un 29% en la microemulsión. El aumento de la absorción se vio que era dependiente de la composición lipídica de la microemulsión, aunque no existe una correlación entre el tamaño de partícula y el aumento de biodisponibilidad.

5.5. Ventajas de las microemulsiones

En la elaboración industrial de las microemulsiones, resulta de gran interés la formación espontánea y la estabilidad termodinámica de las mismas, puesto que las características de la formulación no dependen del orden de incorporación de los componentes, ni de la temperatura de elaboración, ni de la velocidad de agitación, ni de la cinética de enfriamiento, como ocurre con las emulsiones y sus propiedades se mantienen a lo largo del tiempo sin observarse coalescencia, sedimentación o separación de fases, siempre que se conserve la misma composición y el intervalo de temperaturas de estabilidad.

La formación espontánea constituye un factor económico importante, ya que solamente se precisa un mínimo de energía mecánica para facilitar el mezclado y la homogeneización de todos los componentes y un mínimo de energía calorífica cuando sea necesario fundir alguno de ellos. La posibilidad de preparar microemulsiones en frío facilita la incorporación de principios activos termosensibles, aceites esenciales, etc. Por su baja viscosidad, las microemulsiones se adaptan con facilidad a las cadenas de envasado y permiten una correcta dosificación.

Las microemulsiones son en la actualidad unos vehículos de alta innovación tecnológica y ocupan un lugar importante entre los nuevos sistemas terapéuticos para la vectorización de fármacos.

ANFOTERICINA B

1. INTRODUCCION

La anfotericina B (AmB) es un fármaco perteneciente al grupo de los antibióticos poliénicos de acción antimicótica, producido por diferentes especies de *Streptomyces*, encontradas por Gold y colaboradores en bancos de vegetación en descomposición en las orillas del río Orinoco, en Venezuela, en 1956 (Gold, W. et al. 1956). Desde entonces la AmB continúa siendo el fármaco de elección para la mayoría de las infecciones fúngicas a nivel sistémico, a pesar de sus importantes efectos secundarios y el continuo desarrollo de nuevos compuestos (Figura 9).

La estructura química de la AmB fue elucidada en 1970 (Mechlinski, W. et al. 1970). La molécula está compuesta por un gran anillo macrólido cerrado por una lactona con 37 átomos de carbono. Una parte del anillo macrólido está formado por una rígida cadena lipofílica con 7 dobles enlaces y en la parte opuesta hay un número similar de grupos hidroxilo. Por lo tanto la molécula es anfipática y se cree que dicha característica es vital para comprender su mecanismo de acción. El anillo macrólido contiene el aminoazúcar micosamina unido al anillo por un enlace α -glicosídico.

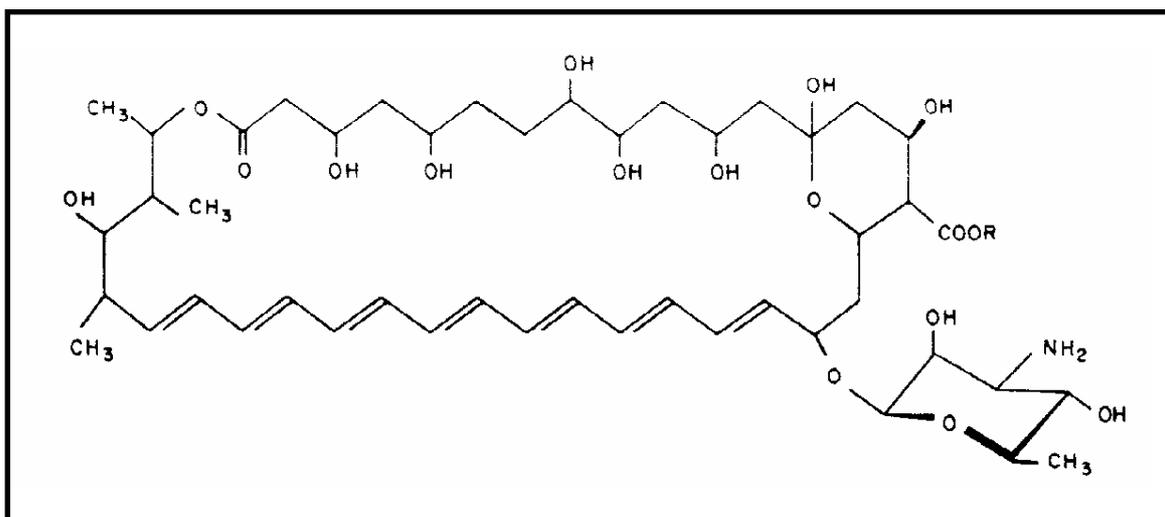


Figura 9. Anfotericina B.

2. MECANISMO DE ACCION

Los lugares de actuación de los antifúngicos deben ser exclusivos de la célula fúngica. Esta premisa limita gran parte de las posibilidades ya que, en ambos casos, el hongo y el hospedador son seres eucariotas. Por este motivo, el desarrollo de estos compuestos no ha sido tan espectacular como el de los antibacterianos. La mayoría de los antifúngicos actúan sobre la síntesis de la membrana celular, puesto que en ella estriba gran parte de las diferencias que existen entre ambos tipos de células.

La membrana celular o citoplasmática de la célula fúngica es muy semejante a la de las células de los mamíferos, con la diferencia de la presencia de ergosterol en lugar de colesterol. Por este motivo, el ergosterol y los diferentes metabolitos y enzimas que participan en su biosíntesis son las dianas de actuación de la gran mayoría de los antifúngicos.

La Figura 10 representa la vía biosintética del ergosterol, indicando los lugares de actuación de diversos antifúngicos. Los más importantes en este grupo son los polienos (anfotericina B), y los compuestos azólicos (ketoconazol, fluconazol e itraconazol).

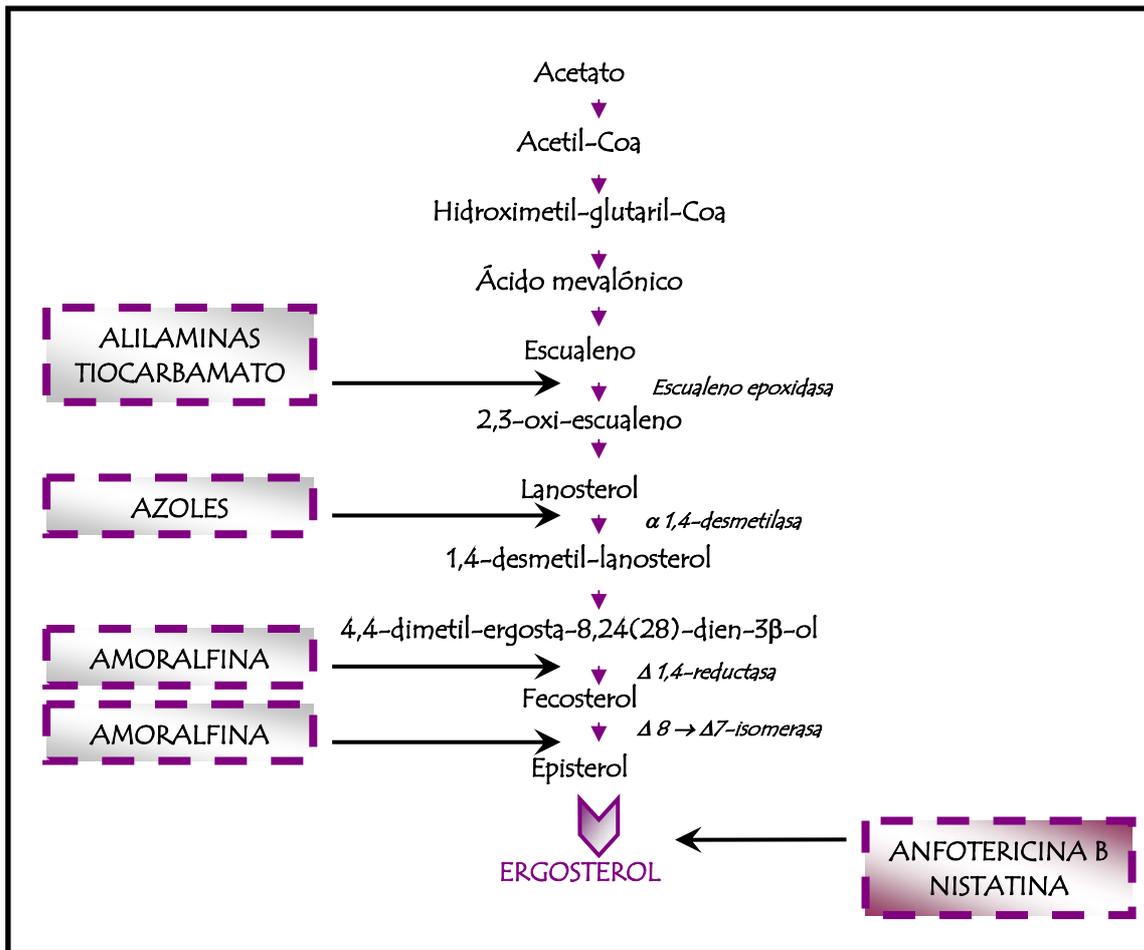


Figura 10. Biosíntesis de ergosterol y lugares de interferencia de los antifúngicos.

Sobre la membrana citoplasmática se dispone la pared celular, esencial para la fisiología del hongo y ausente en las células de los mamíferos. Esta estructura está formada por proteínas y polisacáridos, fundamentalmente quitina, glucanos y mananos, cada uno de estos componentes es una diana potencial para la actuación de los agentes antifúngicos, en las que se centra gran parte de la investigación de los nuevos antifúngicos.

Los demás compuestos antifúngicos actúan interfiriendo en la síntesis de los ácidos nucleicos (flucitosina) o interaccionando con el sistema de microtúbulos que participa en la separación de los cromosomas durante la mitosis (griseofulvina). (Figura 11)

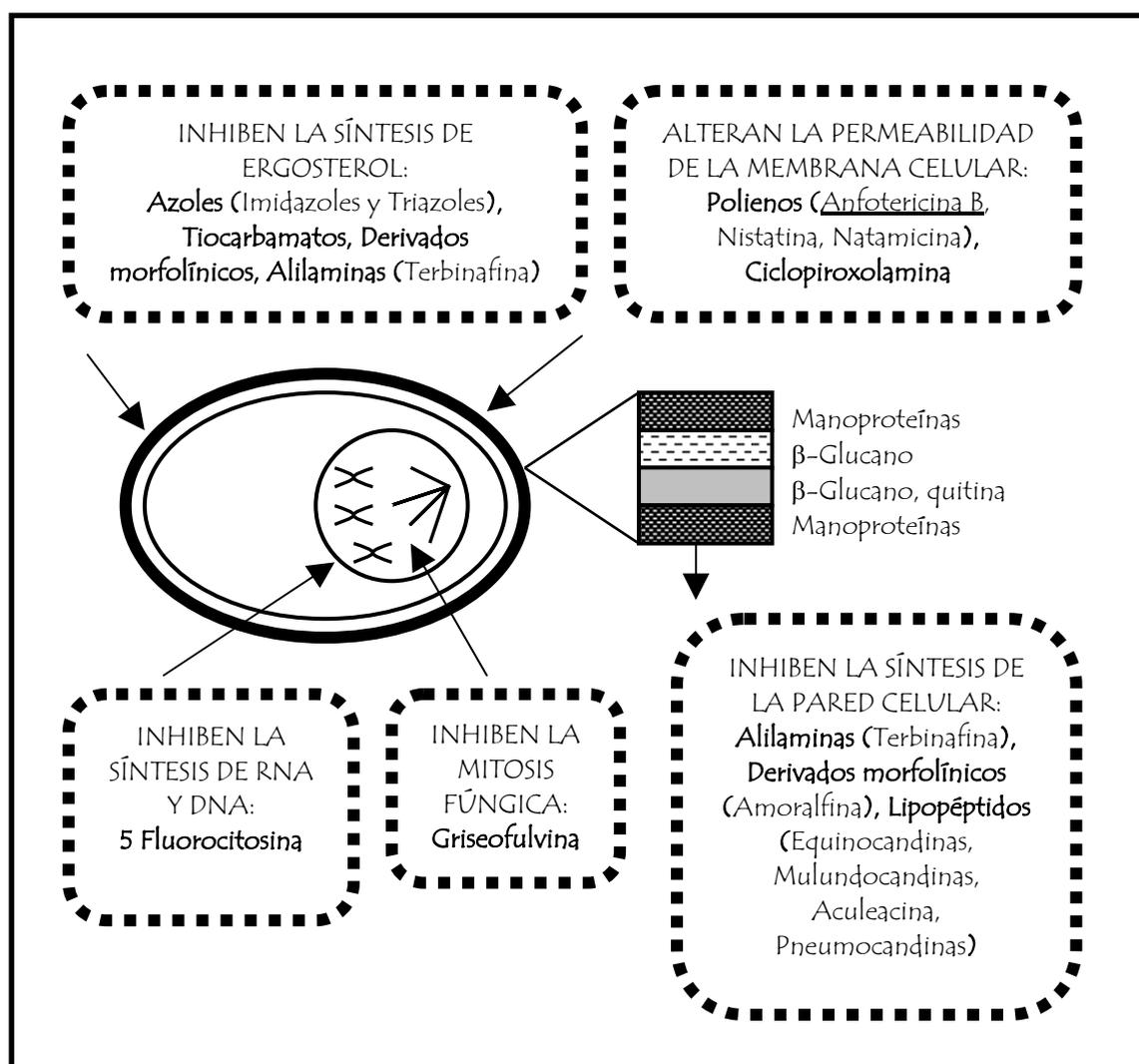


Figura 11. Mecanismo de acción de los compuestos antifúngicos.

Por el momento, los compuestos antifúngicos que actúan sobre la síntesis proteica, sólo existen en fase de investigación.

La AmB se une a los esteroides de la membrana citoplasmática de las células fúngicas produciendo una alteración de la permeabilidad y una pérdida de protones, cationes y metabolitos en la célula esenciales para la vitalidad del hongo, lo que puede conducir a la muerte celular (Figura 12) (Hoitsma, J. A. et al. 1991). Mediante estudios espectrofotométricos se ha demostrado la interacción existente entre los esteroides y los grupos poliénicos (Lampen, J. O. et al. 1959, Schroeder, F. et al. 1971) y, estudios realizados por microscopía electrónica han demostrado la existencia de defectos en membranas expuestas a polienos (Verkleij, A. J. et al. 1973, Tillack, T. W. et al. 1973). Esta alteración en la permeabilidad que produce la anfotericina B en las membranas se ha utilizado para introducir otros agentes en las células fúngicas, como por ejemplo 5-fluorouracilo, o la rifampicina que es un inhibidor de la síntesis de RNA, o la tetraciclina que disminuye la síntesis proteica (Medoff, G. et al. 1971, 1972, Kwan, C. N. et al. 1972). El uso de AmB puede producir efectos reversibles a bajas concentraciones y efectos letales a altas concentraciones (Kotler-Brajtburg, J. et al. 1974, 1977).

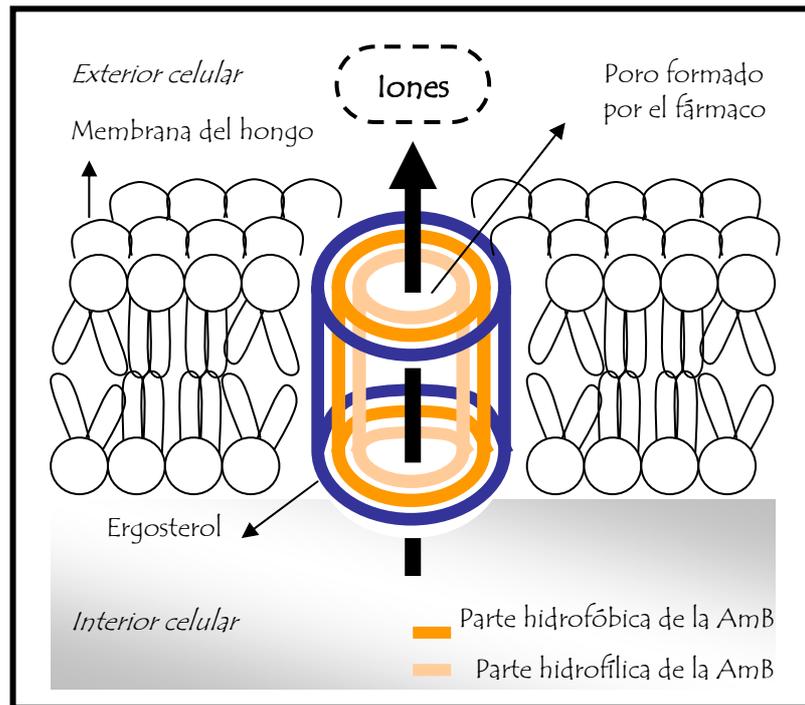


Figura 12. Mecanismo de acción de los antifúngicos poliénicos. La unión al ergosterol daña la membrana. Se produce liberación de iones y daño irreversible del hongo. (Page, C. P. y cols. 1998)

Asímismo se cree que el mecanismo de acción de la AmB es debido a un daño oxidativo en las células fúngicas. La AmB parece provocar una cascada de reacciones oxidativas unidas a su propia oxidación y estos metabolitos oxidados pueden actuar como factores de estimulación de los macrófagos que contribuyen a la acción antifúngica. Por otra parte, en su modo de acción, la anfotericina B tiene propiedades inmunoadyuvantes tanto en relación con la inmunidad serológica como con la mediada por células.

3. NUEVOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

En los últimos años han aparecido nuevas moléculas con actividad antifúngica, muchas de ellas en proceso de investigación. Se intentan buscar nuevos fármacos con alta actividad antifúngica y baja nefrotoxicidad, pero hasta el momento, continua siendo la AmB el fármaco de elección para el tratamiento de micosis sistémicas en pacientes inmunodeprimidos. A continuación mencionamos algunas de las moléculas antifúngicas más importantes en proceso de estudio y desarrollo en los últimos años:

- **Triazoles:** Voriconazol (CAS-137234-62-9, UK-109496) es un nuevo antifúngico con un amplio espectro de acción que puede ser administrado tanto por vía oral como i.v., presenta una farmacocinética compleja ya que es metabolizado por la citocromo P450, y puede presentar interacciones con otros fármacos, y por ello se deben realizar nuevos estudios de toxicidad a nivel clínico (Hoffman, H. L. et al. 2002, Kappe, R. 2001), Ravuconazol (Roberts, J. et al. 2000), Posaconazol (Hoffman, H. L. et al. 2000), SCH-56592 (Barchiesi, F. et al. 2000), VRC, D-0870, UR-9825 (Meletiadis, J. et al. 2002), ER-24161, BMS-207147, SSY-726, CS-758 (Kamai, Y. et al. 2002), SS-750 es un nuevo antifúngico cuyo mecanismo de acción se basa en la unión selectiva de dicha molécula a la citocromo P450 de los hongos (Matsumoto, M. et al. 2002).

- **Imidazoles:** Laniconazol (Fujukawa, K. et al. 2000), AFK-108 (Hori, K. et al. 2000).
- **Poliénicos:** SPK-843 (Bruzzese, T. et al. 2001).
- **Nikomicinas y Polioxinas:** Las nikomicinas más activas son la X, Z, I y J. Son antifúngicos naturales peptidil-nucleosídicos cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la quitín sintetasa, pero que hasta el momento han presentado una actividad atenuada in vivo (Chen, W. et al. 2000, Zhang, D et al. 1999).
- **Osmotina:** Es una proteína PR-5 del tabaco que produce apoptosis en hongos (Narasimhan, M. L. et al. 2001).
- **Lipopéptidos:** *Tipo equinocandinas:* Caspofungina (MK-0991) (CAS) (Groll, A. H. et al. 2001) que ha sido recientemente aprobada para su uso en los Estados Unidos y cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de 1,3- β -D-glucano. Recientes estudios han demostrado que la caspofungina presenta un comportamiento paradójico ya que en un estudio realizado en conejos neutropénicos con CAS a diferentes dosis en comparación con Fungizona[®], a pesar de que los animales tratados con CAS presentaban una mejoría significativa en la supervivencia, dichos animales presentaron un incremento en la carga residual fúngica (log CFU/g) y en el antígeno serológico de galactomanosa (GMI) (Petraitiene, R. et al. 2002). LY-303366 (Roberts, J, et al. 2000). *Otros lipopéptidos:* Micafungina (FK-463) (Muller, F. M. et al. 2001), A-192411.29 (Nilius, A. M., et al. 2000), Tensina obtenido de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* 96578 (Nielsen, T. H. et al. 2000).
- **Azasordarinas:** GW-471552, GW-471558 (Martínez, A. et al. 2001, Herreros, E. et al. 2001).
- **Amiodarona:** Fármaco antiarrítmico que ha demostrado tener una cierta actividad antifúngica (Courchesne, W. E. 2002).
- **Proteínas antifúngicas semejantes a la ciclofilina (CLAP):** han sido aisladas de diversas leguminosas, y además de poseer actividad antifúngica, inhiben la transcriptasa reversa, la proteasa e integrasa del virus HIV-1 (NG, T. B. et al. 2002, Ye, X. Y. et al. 2002). Dentro de este grupo se encuentran la Faseina A y B que son dos proteínas antifúngicas obtenidas de las semillas de *Phaseolus vulgaris* (Ye, X. Y. et al. 2002).
- **Aceite de origanum:** Es un aditivo alimentario que posee un amplio espectro de acción antimicrobiana debido a su alto contenido en derivados fenólicos tales como timol y carvacrol (Manohar, V. et al. 2001).

Existen un gran número de moléculas en la naturaleza con actividad antifúngica, el problema común a prácticamente todas estas moléculas es su toxicidad, ya que es muy difícil encontrar moléculas que sean selectivas y actúen frente a las células fúngicas sin causar daño a las células humanas, por ello, de todo este gran número de compuestos descritos previamente, tan sólo uno, la caspofungina, ha podido ser comercializada hasta el momento. Además, no sólo se han intentado aislar moléculas con actividad antifúngica,

sino que se han intentado mejorar las moléculas existentes mediante cambios en su estructura química, o también se han intentado sintetizar nuevas moléculas en el laboratorio con dicha capacidad. En la Tabla 7 aparecen algunos de los compuestos antifúngicos naturales aislados de organismos presentes en la naturaleza.

Moléculas antifúngicas	Estructura	Organismo de origen	Referencia
Bombardolidas	γ -lactona	Hongo <i>Bombardioidea anartia</i>	Hein, S. M. et al. 2001
Amino alcoholes	Derivados de L-alanina	Esponja marina tropical <i>Haliclona n. sp</i>	Clark, R. J. et al. 2001
Saponina triterpénica	Saponina triterpénica	Hojas de <i>Lepidagathis hyalina</i>	Yadava, R. N. 2001
CJ-19784	Flavona	Hongo <i>Acanthostigmella sp.</i>	Watanabe, S. et al. 2001
Multipolidos A y B	Lactonas	Hongo <i>Xylaria multiplex</i>	Boonphong, S. et al. 2001
Hematocina	Diketopiperazina	Hongo <i>Nectria haematococca</i>	Suzuki, Y. et al. 2000
Brasilonide B	Macrólido	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Mikami, Y. et al. 2000
PF-1163 A y B Xantopocina BE-31405	-	<i>Penicillium sp</i>	Nose, H. et al. 2000, Sasaki, T. et al. 2000, Igarashi, Y. et al. 2000, Okada, H. et al. 1998
Cladosporide A y B-D	Pentanorlanostano	<i>Cladosporium sp.</i>	Hosoe, T. et al. 2001 Hosoe, T. et al. 2000
Glicósidos	Glicósidos	Raíces de <i>Terminalia alata</i>	Srivastava, S. K. et al. 2001
Pinitol, Santolinilol, Hispidulina, Belamcanidina y Ridentina	Mono-sesquiterpenos	<i>Artemisia sp.</i>	Tan, R. X. et al. 1999
PAFP-s	Péptido	Semillas de <i>Phytolacca americana</i>	Shao, F. et al. 1999
Noroudemansina A	Metoxiacrilato	<i>Pterula sp.</i>	Engler-Lohr, M. et al. 1999
Matemicina A y B	Macrolactona	<i>Actinomicetes sp.</i>	Nadkarni, S. R. et al. 1998, Mukhopadhyay, T. et al. 1999
Tetrina C	Macrólido poliénico glicosado	<i>Streptomices sp.</i>	Ryu, G. et al. 1999
Aurantosidos D, E y F	Glicosidos del ácido tetrámico	Esponja marina <i>Siliquariaspongia japonica</i>	Sata, N. U. et al. 1999
Siringomicina E	-	<i>Pseudomonas syringae</i>	Sorensen, K. N. et al. 1998

Tabla 7. Nuevas moléculas antifúngicas aisladas en los últimos 6 años.

Moléculas antifúngicas	Estructura	Organismo de origen	Referencia
Sulfatos de Acanosterol A-J	Sulfatos esteroídicos	Esponja marina <i>Acanthodendrilla sp.</i>	Tsukamoto, S. et al. 1998
Espirofungina	-	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	Holtzel, A. et al. 1998
Arugosina F	-	Hongo <i>Ascodesmis sphaerospora</i>	Hein, S. M. et al. 1998
IWF4	Péptido	Hojas de <i>Beta vulgaris</i>	Nielsen, K. K. et al. 1997
Anserinonas A y B	Benzoquinonas	Hongo <i>Podospora anserina</i>	Wang, H. et al. 1997
Polaramicinas A y B	Macrólidos	<i>Streptomyces higosopicus</i>	Meng, W. et al. 1997
Jerangolidos	-	Myxobacteria <i>Sorangium cellulosum</i>	Gerth, K. et al. 1996
Ascosterosido	Triterpeno	<i>Ascotricha amphitricha</i>	Gorman, J. A. et al. 1996
Maltofilina	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Jakobi, M. et al. 1996

Tabla 7. (Continuación) Nuevas moléculas antifúngicas aisladas en los últimos 6 años.

4. INTERACCIONES DE LA ANFOTERICINA B CON OTROS FÁRMACOS

Podemos resumir las interacciones de la AmB con otros fármacos en cuatro grandes grupos (Tabla 8):

Interacción producida	Fármaco
Aumenta el efecto antimicrobiano	Flucitosina Minociclina Norfloxacino Rifampicina
Disminuye el efecto antimicrobiano	Ketoconazol
Aumenta el efecto del fármaco administrado conjuntamente	Aciclovir Cisplatino Relajantes musculares no despolarizantes
Aumenta la toxicidad del fármaco administrado conjuntamente	Corticoesteroides Glucósidos digitálicos Pentamidina Zidovudina

Tabla 8. Interacciones de la AmB con otros fármacos.

1. Aumenta el efecto antimicrobiano

Incrementa la penetración de la flucitosina, el norfloxacin y la rifampicina en la célula fúngica, debido a la alteración de la permeabilidad de la membrana celular causada por la AmB que aumenta la captación de estos fármacos, o también puede ser debido a un enlentecimiento de la excreción renal de estos fármacos provocada por la nefrotoxicidad que causa la AmB (Beggs, W. H. 1986). La minociclina, debido a su naturaleza lipofílica, también ve incrementado su efecto en presencia de la AmB debido a la interacción del fármaco con los ácidos grasos libres que se encuentran en las membranas de las células fúngicas (Cartwright, R. Y. 1978, Hughes, C. E. et al. 1984).

2. Disminuye el efecto antimicrobiano

Varios estudios han demostrado la ineficacia de la combinación del ketoconazol y de la AmB en tratamientos de infecciones fúngicas, y se ha demostrado la interferencia de la AmB con la acción de otros imidazoles tales como clotrimazol, itraconazol, fluconazol o miconazol (Sud, I. J. 1983).

3. Aumenta el efecto del fármaco administrado conjuntamente

Varios estudios han demostrado el efecto incrementado que ejerce la AmB sobre el aciclovir, el cisplatino y los relajantes musculares no despolarizantes; esto se cree que es debido a la hipocalcemia inducida por la AmB que puede incrementar la actividad de dichos fármacos (Malewicz, B. et al. 1983, Bickers, D. R. 1994).

4. Aumenta la toxicidad del fármaco administrado conjuntamente

La pérdida de potasio ejercida por la AmB puede verse incrementada por la administración conjunta de corticoesteroides (hidrocortisona), glucocorticoides, mineralocorticoides, inhibidores de la anhidrasa carbónica, corticotropina (ACTH) y glicósidos digitálicos, incrementando la toxicidad de dichos fármacos y pudiendo causar en el paciente una disfunción cardíaca (Bickers, D. R. 1994). También el uso de fármacos que causan nefrotoxicidad tales como pentamidina parenteral, aminoglucósidos, ciclosporina A o diuréticos, asociado a la administración de AmB puede incrementar el riesgo de aparición de toxicidad renal, por eso la administración simultánea de estos fármacos debe realizarse bajo un estricto control médico (Antoniskis, D. et al. 1990). El uso concomitante de la AmB junto con agentes antineoplásicos puede incrementar el riesgo de aparición de broncoespasmos, hipotensión y toxicidad renal. También el uso de AmB junto con sucralfato disminuye los niveles plasmáticos de colistina (19%), por su posible formación de quelatos no absorbibles, y junto con la zidovudina se potencia la mielotoxicidad y la nefrotoxicidad. (USP DI 2000)

El uso simultáneo de radioterapia junto con AmB puede incrementar el riesgo de anemias u otros efectos hematológicos.

5. NUEVAS FORMULACIONES DE AMB

En las últimas décadas los investigadores han evaluado el uso de vesículas de fosfolípidos conocidas como liposomas como un sistema de vectorización para la administración de AmB, con el objetivo de atenuar sus efectos nefrotóxicos e incrementar su potencial terapéutico.

Lopez-Berestein y sus colaboradores crearon la primera formulación liposomal de AmB experimentada en humanos (Lopez-Berestein, G. et al. 1984). Su experiencia sirvió para el desarrollo de nuevas formulaciones lipídicas de AmB por la industria farmacéutica. En diciembre de 1995 fue aprobada por la FDA (U. S. Food and Drug Administration) la comercialización en Estados Unidos de la primera formulación lipídica de AmB en forma de complejo lipídico o ABLC, denominada Abelcet[®] (The Liposome Co., Princeton, NJ). Posteriormente, otra formulación lipídica de AmB en forma de dispersión coloidal, ABCD (Amphotec[®]; Sequus Pharmaceuticas, Menlo Park, CA), recibió la aprobación por parte de la FDA en diciembre de 1996. Recientemente un tercer producto en forma de liposomas, ya comercializado en otros países, fue aprobado por la FDA en agosto de 1997, (L-AmB). (AmBisome[®]; NeXstar Pharmaceuticals/Fujisawa, San Dimas, CA). (Figura 13)

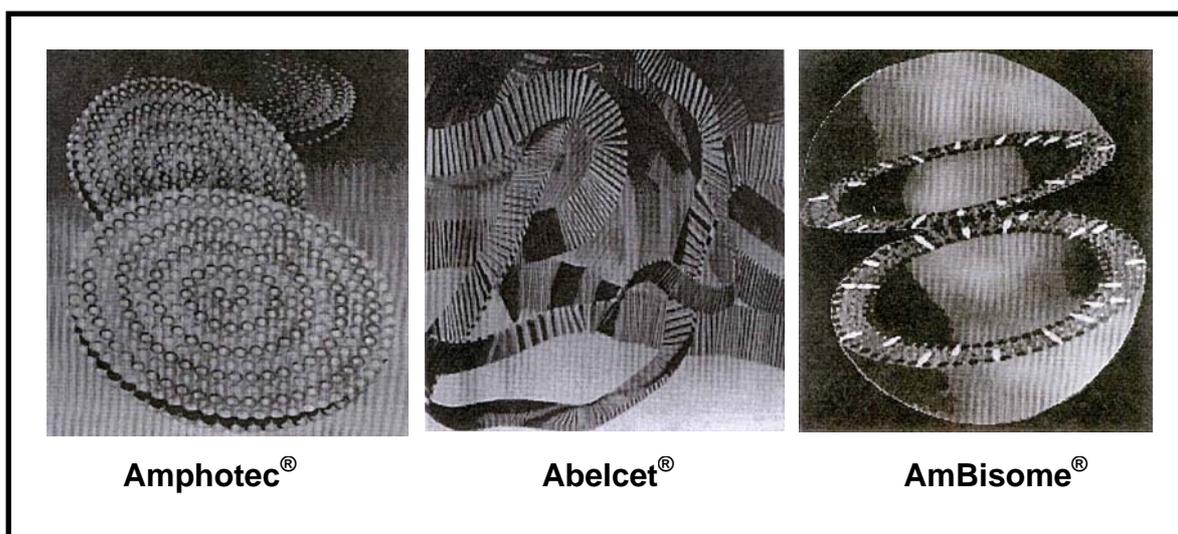


Figura 13. Nuevas formulaciones de AmB. (Boswell, G. W. et al. 1998)

Actualmente se está estudiando la posible eficacia de formulaciones en aerosol de AmB liposomal y complejos lipídicos de AmB para el tratamiento preventivo de infecciones fúngicas sistémicas en pacientes transplantados de pulmón (Ruijgrok, E. J. et al. 2000, Palmer, S. M. et al. 2001).

También se está investigando una nueva formulación de AmB en forma de emulsiones lipídicas. Esta nueva formulación se prepara mediante la mezcla de AmB con emulsiones lipídicas usadas para nutrición parenteral, de manera que se convierte en una formulación barata y muy fácil de preparar (Storm, G. et al. 1997). No obstante, deben realizarse nuevos estudios para evaluar los posibles daños renales y extrarrenales y la eficacia terapéutica del fármaco.

Echevarría, y sus colaboradores han desarrollado nanosferas y mezclas micelares de AmB con poloxamer que han resultado ser menos tóxicas en estudios *in vivo* realizados en ratas (Echevarría, I. et al. 2000). También han resultado tener menos capacidad hemolítica sin perder la actividad antifúngica, nuevas formulaciones de partículas de complejos de AmB con fosfolípidos preparadas por atomización (APCPs) (Kim, J. C. et al. 2001), o nuevas formulaciones de micelas de un copolímero denominado PEO-b-PHSA en el cual se introduce la AmB (Lavasanifar, A. et al. 2002).

Uno de los avances más recientes dentro de las formulaciones lipídicas de AmB, es el desarrollo de nuevos liposomas con propiedades particulares, tales como los inmunoliposomas (IL), los liposomas de larga circulación (LCL) o los cocleatos. Los IL contienen en su superficie anticuerpos específicos de hongos que los vectorizan directamente a la célula fúngica. Se han realizado varios estudios en los que se comprobó la mejor actividad de los IL frente a L-AmB en ratones con aspergilosis pulmonar y también se comprobó la mayor eficacia de los IL frente a la AmB incorporada en LCL (Otsubo, T. et al. 1998). Los LCL están recubiertos con polietilenglicol, lo que les proporciona una superficie estéricamente estabilizada que les permite permanecer mayor tiempo en la circulación, por lo que un mayor número de liposomas puede llegar intacto al lugar de la infección, mejorando así la eficacia *in vivo* (Storm, G. et al. 1997).

Los cocleatos son ensamblajes supramoleculares lipídicos, compuestos por fosfolípidos cargados negativamente, productos naturales y cationes divalentes. Varios estudios realizados con AmB cocleato han demostrado que dosis elevadas de hasta 20 mg/kg son muy eficaces y reducen considerablemente los efectos renales perjudiciales en comparación con L-AmB (Graybill, J. R. et al. 1999).

Varios estudios realizados han intentado modificar ligeramente la estructura de la AmB para disminuir su toxicidad sin alterar su eficacia, entre las modificaciones realizadas se encuentran: AmB metil ester, N-ornil AmB metil ester, V-28-3B-metil ester y la conjugación de AmB con arabinogalactano mediante un enlace imina o amina. Muchas de estas modificaciones han alterado la eficacia de la AmB y por lo tanto se ha abandonado la investigación y otros están en proceso de estudio como los conjugados de AmB con β -arabinogalactano que han demostrado una baja toxicidad del compuesto en ratones, pero se deben realizar nuevos estudios con el fin de determinar su eficacia *in vivo*. (Ehrenfreund-Kleinman, T. et al. 2002).

5.1. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de AmBisome[®] ha sido documentado gracias a estudios *in vitro* e *in vivo* que muestran como los liposomas de AmBisome[®] y los liposomas sin principio activo se acumulan en el lugar del organismo donde se encuentra la infección fúngica, y se pegan a la pared celular de los hongos tanto filamentosos como no. La rotura de los liposomas de AmBisome[®] ocurre tras la unión de dichos liposomas con la pared fúngica, lo que conlleva la unión de la AmB al ergosterol de la membrana fúngica, produciendo la lisis celular (Fujii, G. 1996, Hiemenz, J. W. et al. 1996, Adler-Moore, J. et al. 1993).

Este mecanismo de acción difiere del propuesto para Abelcet[®], en el que las lipasas fúngicas actúan para liberar la AmB en los tejidos y para Amphotec[®], en el que el producto es fagocitado por el sistema reticuloendotelial y libera la AmB a la circulación (Perkins, W. R. et al. 1992, Fielding, R. M. et al. 1992).

Cuando la AmB se encapsula en los liposomas o se formula en forma de complejos lipídicos o dispersiones coloidales la toxicidad hacia células humanas se ve reducida notablemente. Esto permite usar mayores concentraciones de AmB durante periodos más largos de tiempo, sin variar la eficacia del principio activo (Walsh, T. J. et al. 1998, Sequus Pharmaceuticals 1998, The Liposome Company 1988).

5.2. Composición y estructura

En AmBisome[®], la AmB se une fuertemente a la membrana liposomal mediante la formación de uniones de carga no covalentes entre la micosamina positivamente cargada de la AmB y el diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) cargado negativamente e interacciones hidrofóbicas con el colesterol de la membrana. La capa lipídica está formada por fosfatidil colina deshidrogenada, colesterol, DSPG y AmB en una proporción 2:1:0.8:0.4 (Adler-Moore, J. et al. 1993) (Tabla 9).

Por el contrario Abelcet[®] es un complejo lipídico en el que la AmB está unida a dos fosfolípidos: dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) (Janoff, A. S. et al. 1988). Amphotec[®] es una dispersión coloidal de AmB en el que la AmB se une a colesterilsulfato (Guo, L. S. S. et al. 1993).

Las moléculas constituyentes de las emulsiones lipídicas son: triglicéridos, fosfatidilcolina de huevo y glicerol. Deben realizarse nuevos estudios ya que no se sabe con certeza el tipo de complejos que forman estos compuestos con AmB formulada con deoxicolato sódico (Storm, G. et al. 1997).

Producto	Fabricante	Tamaño	Configuración
AmBisome[®]	NeXstar Pharmaceuticals	45-80 nm tamaño medio de volumen por DLS*	Liposomas unilaminares de tamaño esférico (criofractura electromicroscópica)
Amphotec[®]	The Liposome Company	Diámetro hidrodinámico medio de 115nm. Grosor 4 nm (DLS con laser).	Complejos en forma de disco sin volumen interno acuoso (EM* y difracción de rayos X)
Abelcet[®]	Sequus Pharmaceuticals	1.6-11.1 μm (el 90% de las partículas tienen un tamaño de 1.6-6 μm)	Estructuras en forma de lazo (EM y difracción de rayos X)

*DLS, dynamic light scattering; EM, Microscopio electrónico

Tabla 9. Tamaño y configuración de nuevas formulaciones de AmB

5.3 Costes de la terapia

Actualmente estas nuevas formulaciones de AmB tiene un uso limitado debido a su excesivo coste y su uso está restringido a aquellos pacientes que no toleran la AmB en forma de deoxicolato sódico (Fungizona[®]), ya que los efectos adversos de esta formulación son muy elevados (Tabla 10).

Producto	Cantidad (g)	Precio* (\$)	Dosis (mg/kg/d)	Dosis (paciente de 70 kg) (mg/d)
Fungizona®	1	11.29	0.5-1	35-70
AmBisome®	1	3768.00	1-5	70-350
Abelcet®	1	2000.00	1-5	70-350
Amphotec®	1	1600.00	1-4	70-280

*Datos obtenidos del Red Book año 2000 (Compañía de economía médica).

Tabla 10. Comparación del coste de la terapia antifúngica con diferentes formulaciones de AmB.

6. FARMACOCINÉTICA DE AMB

6.1. Aplicación de los ordenadores en farmacocinética

El uso de los ordenadores ha facilitado enormemente el desarrollo de los estudios farmacocinéticos. Existen una serie de programas informáticos que hacen más sencillos los cálculos en los estudios farmacocinéticos y que poseen entre otras, las siguientes características:

1. Ajustan las concentraciones del fármaco frente al tiempo a una serie de modelos farmacocinéticos, y elijen aquel al que mejor se ajuste.
2. Ajustan los datos a modelos farmacocinéticos y farmacodinámicos definidos por el usuario.
3. Realizan simulaciones.
4. Se pueden aplicar en farmacocinética clínica.

A continuación se citan los programas informáticos usados en el desarrollo de esta memoria y la dirección de internet en la que se pueden consultar sus características más detalladamente:

- **WINNONLIN (www.pharsight.com/tools/wnl/index.htm)**

Este programa es fácil de usar tanto para análisis compartimental como no compartimental de datos. Con este programa compatible con Excel se pueden manejar un gran número de sujetos y perfiles diferentes. Posee una gran librería de modelos para regresión no lineal y se pueden estimar parámetros farmacocinéticos, este software además proporciona para cada parámetro los intervalos de confianza.

Este ha sido el programa utilizado para analizar los datos farmacocinéticos que se recojen en la parte experimental de esta Tesis doctoral.

- **S-PLUS 2000 (www.stats.ox.ac.uk/pub)**
Es un programa que aporta mejoras en facilidad de manejo, rendimiento y fiabilidad. Contiene nuevas funciones y diálogos para modelos de efectos mixtos, análisis de supervivencia, control de calidad y análisis discriminante. También incluye documentación actualizada, enlaces a Bloomberg y a otros suministradores de datos financieros y herramientas mejoradas para el manejo de datos. Se empleó en esta Memoria para el análisis de los datos de eficacia.
- **STATGRAPHICS (www.statgraphics.com)**
Es un programa de análisis estadístico que incluye conexión directa con datos externos, asistente de uso, gráficos e informes, diseño de experimentos, control de calidad y análisis de datos vivos. Se empleó en esta Memoria para el análisis estadístico de los datos.
- **E-VIEWS ECONOMETRIC VIEWS (www.estim.com.tr/Eviews.html)**
Es un programa sencillo, que lleva incorporadas las herramientas econométricas y de predicción más frecuentes que se empleó en esta Memoria para el cálculo de la Dosis Letal 50 (DL₅₀)
- **KINETICA 2000 (www.innaphase.com/kinetica.htm)**
Es un programa farmacocinético y farmacodinámico de gran utilidad en estudios poblacionales.
- **ADAPT II**
Este programa es de gran utilidad para crear modelos farmacocinéticos mediante el uso de ecuaciones integrales y diferenciales, también permite simulaciones y regresión no lineal.

6.2. Farmacocinética de AmB

Tras la administración oral en humanos, la AmB presenta una absorción casi nula en el tracto gastrointestinal. Tras una administración por vía oral de 3 g/día se pueden llegar a alcanzar concentraciones plasmáticas de 0,1-0,3 µg/ml, es por ello que la vía de elección para el tratamiento de las infecciones fúngicas sistémicas sea la vía endovenosa, y en casos de meningitis, la raquídea (Gallis, H. A. et al. 1990, Ching, M. S. et al. 1983). No se emplea la vía intramuscular, ya que su aplicación es dolorosa y por eso se administra por perfusión intravenosa lenta. Para dosis superiores a 50 mg se pierde la proporcionalidad de las dosis, y las concentraciones plasmáticas observadas son menores que las estimadas según las bases de linealidad (Daneshmend, T. K. et al. 1983).

Tras la administración por perfusión i.v. en humanos, la AmB se separa del deoxicolato y se une a proteínas séricas sobre todo a β-lipoproteínas (91-95%) y eritrocitos. También se fija a los tejidos, probablemente a las membranas celulares que contienen colesterol, por lo que su volumen de distribución es elevado, aproximadamente 4 l/kg (Brajtburg, J. et al. 1984). Penetra mal en los diversos compartimentos del organismo, apenas atraviesa la barrera hematoencefálica, si bien atraviesa la placentaria. Entre los diversos tejidos, las mayores concentraciones de AmB se alcanzan en hígado, bazo, riñón y pulmones. El hígado es el sitio donde se produce la mayor acumulación, conteniendo más del 41% del total de la dosis (Christiansen, K. J. et al. 1985). La AmB se acumula poco en tejido adiposo y en músculo. La concentración de AmB en líquidos peritoneal, pleural y sinovial es habitualmente menor del 50% de la concentración plasmática, mientras que en el líquido cefalorraquídeo no llega al 4% de la concentración plasmática, aunque las variaciones interindividuales son muy grandes.

Un 3% de la AmB administrada se elimina por orina y la mayoría del fármaco se metaboliza en el hígado y se elimina por bilis (Craven, P. C. et al. 1979). Se han demostrado niveles detectables del antibiótico en bilis más de 12 días después de su administración, en orina después de 23-35 días y en algunos tejidos, como el hepático y el renal, 12 meses después de finalizado el tratamiento y no se detectan sus metabolitos ni en sangre ni en orina (Benson, J. M. et al. 1988). El aclaramiento total (Cl) de la AmB es de aproximadamente 1,8 l/h, mientras que el aclaramiento renal (Cl_R) es muy inferior, sobre 1 ml/min (0,06 l/h).

La AmB sigue un patrón bifásico o trifásico, según los autores (Hutchaleelaha, A. et al. 1997, Atkinson, A. J. et al. 1978), de eliminación plasmática, con una semivida inicial de 24-48 horas, seguida de una fase de eliminación más lenta que dura unos 15 días, probablemente debido a una redistribución desde los tejidos periféricos extraordinariamente lenta.

Según Atkinson y sus colaboradores tras una administración i.v. de 1 mg/kg de AmB se obtienen concentraciones plasmáticas en un rango de 0,5-4 µg/ml que disminuye con otros tratamientos adicionales y la concentración en estado estacionario alcanza una concentración de 0,5 µg/ml (Atkinson, A. J. et al. 1978). Sólo el 5-10% del fármaco es excretado por orina o bilis. La hemodiálisis habitualmente no modifica la concentración plasmática de AmB, excepto en pacientes hiperlipidémicos en los que la concentración disminuye aparentemente debido a la unión a la membrana de diálisis del complejo AmB-lipoproteínas.

El perfil farmacocinético de este fármaco varía en los niños en los que se ha descrito un volumen de distribución menor (<4 l/kg) y mayor aclaramiento (>0,026 l/h). Las concentraciones plasmáticas máximas se encuentran reducidas, siendo el 50% aproximadamente de las alcanzadas en los adultos con dosis equivalentes.

En la insuficiencia renal grave puede aumentar el aclaramiento plasmático total de anfotericina B, apareciendo una disminución en la concentración plasmática del fármaco; puesto que la eliminación renal de la AmB sin modificar es más baja en los pacientes urémicos, el incremento en el aclaramiento del fármaco en estos pacientes no puede explicarse por las modificaciones en la función renal. Aunque no se han identificado metabolitos de la AmB, parece evidente que la principal vía de eliminación es la hepática. Esto sugiere que el aclaramiento hepático aumenta cuando falla la función renal (Flórez, J. et al. 1997). En un estudio realizado por Morgan y sus colaboradores, el Cl_R en pacientes con fallo renal (de 1 a 2,4 l/h), no fue significativamente diferente al observado en pacientes sanos voluntarios, las concentraciones séricas fueron menores, presentando un Vd mayor, probablemente causado por una disminución en la unión a proteínas. Y cuando se corrigieron las concentraciones plasmáticas, teniendo en cuenta la menor unión a proteínas no se encontraron diferencias significativas entre individuos sanos y con insuficiencia renal (Morgan, et al. 1983).

Las nuevas formulaciones de la AmB han demostrado poseer propiedades farmacocinéticas que difieren de las de la AmB acomplejada con deoxicolato sódico. Este comportamiento diverso puede explicar la causa de su menor toxicidad y puede permitir aproximarnos a su posible mecanismo de acción (Tabla 11). Aunque la interpretación de los valores de los parámetros farmacocinéticos resulta complicada, ya que los métodos de detección de la AmB en sangre no diferencian entre AmB libre y la unida a proteínas o encapsulada en liposomas o formando complejos lipídicos.

Fármaco (dosis)	C _{max} (µg/ml)	AUC (µgh/ml)/	V(l/kg)	CL(ml/h/kg)
AmBisome [®] (5 mg/kg)	83,0 ± 35,2	555 ± 311	0,11 ± 0,08	11 ± 6
Amphotec [®] (5 mg/kg)	3,1	43	4,3	117
Abelcet [®] (5 mg/kg)	1,7 ± 0,8	14 ± 7	131 ± 7,7	436 ± 188,5
Fungizona [®] (0,6 mg/kg)	1,1 ± 0,2	17,1 ± 5	5 ± 2,8	38 ± 15

C_{max}: Máxima concentración plasmática; CL: Aclaramiento; AUC: Área bajo la curva; V: Volumen de distribución

Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos comparativos de formulaciones de AmB tras la administración de dosis múltiples en humanos.

6.2.1. Complejos lipídicos de anfotericina B (ABLC, Abelcet[®])

Datos en animales

Varios estudios en animales han permitido comparar las concentraciones en tejidos, DL₅₀ (dosis letal 50), y el efecto terapéutico de ABLC en comparación con la AmB convencional. Dosis únicas de ABLC (1 mg/kg) inyectadas a ratones y conejos generaron menores concentraciones plasmáticas pero mayores concentraciones en hígado, bazo y pulmones, y ligeramente menores concentraciones en riñones en comparación con la formulación convencional de AmB (Hiemenz, J. W. et al. 1996, Clark, J. M. et al. 1991).

Datos en humanos

Al igual que los datos obtenidos en animales, los niveles plasmáticos de ABLC son menores y se obtienen mayores concentraciones en hígado, bazo y pulmones en comparación con la formulación convencional de AmB (Hiemenz, J. W. et al. 1996). Se obtienen valores menores de AUC y valores significativamente mayores del volumen de distribución y aclaramiento tras la administración de ABLC en comparación con la AmB convencional (Kan, V. Et al. 1991). Sin embargo las concentraciones obtenidas en riñón son semejantes para ambas formulaciones, e incrementos en la dosis de ABLC producen un aumento significativo en las concentraciones del fármaco en hígado, bazo y pulmones, sólo un ligero aumento en los riñones mientras que no se elevan los niveles plasmáticos (Janoff, A. S. et al. 1993, Olsen, S. J. et al. 1991). LD₅₀ para ABLC es de 40 mg/kg en comparación con el valor de 3 mg/kg para la AmB convencional (Hiemenz, J. W. et al. 1996). Además, mientras que niveles elevados de colesterol, particularmente los niveles de colesterol LDL, alteran la nefrotoxicidad y la disposición de la AmB convencional, el comportamiento farmacocinético y la toxicidad renal de ABLC es independiente de las elevaciones de los niveles de colesterol LDL.

El aumento del aclaramiento y el mayor volumen de distribución en estado estacionario así como las bajas concentraciones séricas de AmB tras la administración de

ABLC, puede sugerir que ABLC permanece en la circulación sistémica hasta que son degradados por fosfolipasas, son secuestrados por células fagocíticas o desaparecen de la circulación sanguínea a través del endotelio discontinuo del tejido fagocítico mononuclear. ABLC aumenta la distribución a los tejidos de AmB en comparación con la AmB convencional. Esto favorece la penetración a los tejidos lo que produce mayores concentraciones intracelulares de AmB, y esto se traduce en un beneficio clínico en el tratamiento de micosis sistémicas permitiendo que llegue más fármaco a los tejidos infectados (Rapp, R. P. et al. 1997).

6.2.2. Dispersión coloidal de anfotericina B (ABCD, Amphotec®)

Datos en animales

Las propiedades farmacocinéticas de ABCD se compararon con la AmB convencional en ratas, perros y ratones. De los resultados de estos estudios se dedujo que en comparación con la AmB convencional los niveles plasmáticos de ABCD son menores, presenta una mayor semivida, un mayor volumen de distribución y una concentración menor en riñones. El aclaramiento de AmB desde los tejidos fue mucho más lento para ABCD que para la formulación convencional de AmB, pero al igual que con ABLC, la concentración en hígado es mayor (Fielding, R. M. et al. 1991).

Datos en humanos

Sanders y sus colaboradores estudiaron la farmacocinética y la tolerabilidad de dosis únicas de ABCD de 0,25 a 1,5 mg/kg en 15 pacientes sanos. Los parámetros obtenidos se ajustaron a un modelo tricompartmental en el que el C_{max}, el AUC y el V_{ss} aumentan proporcionalmente según la dosis, y el Cl permanece constante en ese rango de concentración.

Amantea y sus colaboradores realizaron un estudio farmacocinético poblacional de ABCD y su efecto en la función renal en 75 pacientes recibiendo trasplantes de médula ósea (Amantea, M. A. et al. 1995). Los pacientes recibieron diversas dosis de ABCD (de 0,5 a 8 mg/kg/día) durante 28 días. Se monitorizaron las concentraciones plasmáticas y los valores de creatinina séricos. Los parámetros farmacocinéticos de ABCD se ajustaron a un modelo bicompartimental, con un incremento del aclaramiento plasmático y el volumen de distribución, con dosis mayores. La semivida terminal de eliminación fue de 29 h. Durante la terapia no se observó ningún cambio en la función renal de los pacientes, y por lo tanto se concluyó que ABCD pareció ser una formulación segura y no tóxica en pacientes transplantados de médula ósea. Como en todos los estudios, sólo se determinó la concentración total de AmB.

6.2.3. Anfotericina B liposomal (L-AmB, AmBisome®)

Datos en animales

Las propiedades farmacocinéticas de L-AmB se han investigado en ratones, ratas y conejos. A pesar de que L-AmB se concentra particularmente en los órganos del sistema reticuloendotelial, al igual que otras formulaciones lipídicas de AmB, la captación por parte de estas células es más lenta en comparación con ABCD o ABLC. Aunque no se conocen del todo los mecanismos que producen mayores concentraciones plasmáticas de L-AmB puede que jueguen un papel importante el pequeño tamaño de gotícula, con un

diámetro menor de 100 nm, el uso de una bicapa lipídica relativamente más rígida y la alta transición de temperatura de sus componentes lipídicos (Adler-Moore, J. P. et al. 1998, Storm, G. et al. 1998). El mayor impacto en las propiedades farmacocinéticas de esta formulación es que no sólo presenta mayores concentraciones plasmáticas sino que permanece mayor tiempo en circulación en comparación con otras formulaciones lipídicas (Lee, J. W. et al. 1994, Proffitt, R. T. et al. 1991).

Estudios realizados por Gondal y sus colaboradores en ratones, demostraron que las concentraciones de AmB en hígado y bazo eran mayores mientras que las concentraciones de AmB en riñón y pulmones eran comparables para L-AmB y Fungizona® (Gondal, J. A. et al. 1989).

Boswell y sus colaboradores investigaron el perfil farmacocinético y toxicológico de L-AmB en ratas tras la administración de dosis únicas y múltiples (Boswell, G. W. et al. 1998). A las ratas se les administró dosis de 1, 3, 9 y 20 mg/kg/día. Los resultados obtenidos indicaron que para dosis de 20 mg/kg/día de L-AmB se obtuvieron concentraciones plasmáticas de AmB 100 veces mayores en comparación con la AmB convencional y que a esas dosis L-AmB producía una ligera nefrotoxicidad y una moderada hepatotoxicidad.

Tras la administración de L-AmB en conejos sanos, se obtuvieron concentraciones entre 4 y 7 veces mayores en tejido cerebral que con Fungizona®, ABCD o ABLC. A pesar de ello, ninguna de las formulaciones lipídicas de AmB ni la formulación convencional presentan niveles detectables en líquido cefalorraquídeo en ausencia de inflamación meningocerebral (Groll, A. et al. 1997).

Datos en humanos

Los parámetros farmacocinéticos para L-AmB en humanos son similares a los obtenidos en animales. Los picos medios y los niveles plasmáticos mínimos obtenidos para AmB tras el tratamiento con L-AmB a una dosis de 4 mg/kg fueron de 46 µg/ml y 4 µg/ml respectivamente. Al igual que en los datos obtenidos en animales, las concentraciones en tejidos, determinadas tras realizar la autopsia a 3 pacientes fue mayor en hígado y bazo (Ringden, O. et al. 1991).

Se determinó el AUC para las dosis de L-AmB de 1, 2,5 y 5 mg/kg/día. Se observó que seguía una cinética no lineal, con un patrón de eliminación bifásico. Este modelo sugiere una captación del fármaco por las células del sistema reticuloendotelial seguido de una redistribución (Walsh, T. J. et al. 1995). También Heinemann y sus colaboradores observaron una eliminación bifásica de L-AmB (Heinemann, V. et al. 1997).

Walsh y sus colaboradores administraron L-AmB a 36 pacientes con fiebre neutropénica en varias dosis. El tratamiento se mantuvo hasta erradicar la enfermedad. Un dato de interés fue que dosis elevadas de L-AmB de 7,5 mg/kg/día presentaron un AUC en el primer día de terapia considerablemente mayor que el observado el último día, por el contrario para dosis de L-AmB de 1, 2,5 y 5 mg/kg/día los valores de AUC fueron menores el primer día que el último. Estos resultados pueden sugerir que existe un mecanismo alternativo de eliminación de la AmB dosis dependiente provocado cuando L-AmB se usa a dosis elevadas (Walsh, T. J. et al. 1998).

En un estudio realizado por Heinemann y sus colaboradores, se administró L-AmB a un paciente con fallo renal transplantado agudo y aspergilosis pulmonar. Se observaron concentraciones máximas y mínimas elevadas en plasma de AmB al igual que en pulmón. Los autores pensaron que estas concentraciones anormales de fármaco en tejidos pueden ser debidas a que por un funcionamiento anormal del tejido hepático, disminuye el aclaramiento hepático y por lo tanto el aclaramiento pulmonar comienza a adquirir importancia (Heinemann, V. et al. 1997).

6.2.4. Emulsiones lipídicas de anfotericina B

Ayestaran y sus colaboradores, (Ayestaran, A. y cols. 1996), compararon el comportamiento farmacocinético de AmB en emulsiones lipídicas con AmB deoxicolato sódico en una solución de dextrosa al 5% en 16 pacientes neutropénicos con infecciones fúngicas. De los resultados obtenidos se pudo concluir que el perfil farmacocinético de la AmB en emulsiones lipídicas difiere de la AmB en una solución de dextrosa al 5%. Las mayores diferencias se observaron en el volumen de distribución en estado estacionario y el volumen de distribución del compartimento central, que fueron mayores para la AmB en emulsión lipídica, siendo AUC y Cmax menores.

7. TOXICIDAD DE AMB

La toxicidad es el conjunto de manifestaciones no deseables que siguen a la administración de cualquier sustancia en un organismo vivo. Existen dos tipos de toxicidad, la toxicidad aguda tras dosis única, que aparece rápidamente de forma inmediata después de una única toma del medicamento a dosis muy superiores a las habitualmente utilizadas en terapéutica, o tras dosis múltiple, que se manifiesta a corto plazo después de varias administraciones consecutivas, y la toxicidad crónica, que se manifiesta tardíamente, como consecuencia de la administración repetida y prolongada en el tiempo de una determinada sustancia activa, y que es consecuencia de la acumulación de esta sustancia en el organismo hasta alcanzar un valor crítico.

Para determinar la toxicidad de un medicamento, antes de su comercialización se debe someter a ensayos de toxicidad en animales (ratón, rata, conejo, cobaya, perro o mono), para determinar la dosis letal 50 (dosis que provoca la muerte del 50% de los animales sometidos al ensayo expresada en mg/kg). Sin embargo debe señalarse que la toxicidad es función de numerosos factores tales como: vía de administración, concentración del principio activo, animal de experimentación, condiciones del ensayo, características intrínsecas del principio activo y metabolismo del principio activo.

7.1. Mecanismos de toxicidad

Los mecanismos de toxicidad de la AmB no están del todo claros. El aclaramiento renal del fármaco es muy lento, excretándose sin modificación menos de un 5% del fármaco administrado y sólo un 0.3-2.0% de la AmB se fija al tejido renal (Kaloyanides, G. J. 1994, Christiansen, K. J. et al. 1985). La nefrotoxicidad es el resultado directo de la acción de la AmB sobre los túbulos renales así como de la inducción de una vasoconstricción renal y como consecuencia se produce una reducción en el flujo sanguíneo renal y en la tasa de filtración glomerular (Baley, J. E. et al. 1990). También se ha demostrado "in vivo" que parte de la nefrotoxicidad puede ser causada por el vehículo de la formulación que es deoxicolato sódico (Zager, R. A. et al. 1992).

La AmB es insoluble a pH neutro y por lo tanto el fármaco se formula con deoxicolato sódico, formando agregados que una vez reconstituida forma una suspensión coloidal. Estos agregados son relativamente inestables y se disocian rápidamente después de la administración, liberando la AmB a la circulación sanguínea.

Los principales mecanismos de toxicidad están representados en la Figura 14 y son discutidos a continuación:

1. Cambios en la permeabilidad de la membrana

Los efectos nefrotóxicos de la AmB están mediados por cambios en la permeabilidad de membrana, el mismo mecanismo que es responsable de la actividad antifúngica (Sawaya, B. et al. 1995). La AmB libre actúa uniéndose a los esteroides, y particularmente al ergosterol de la membrana fúngica. Además, pero en grado menor, la AmB también se une a los esteroides de las células eucariotas, como por ejemplo colesterol, y esto produce un efecto nefrotóxico ya que las células del riñón son muy ricas en colesterol. La estructura de la AmB permite que dicha molécula funcione como un falso fosfolípido y penetra en las membranas celulares donde ejerce principalmente dos efectos dañinos: el oxidativo, y el ionofórico.

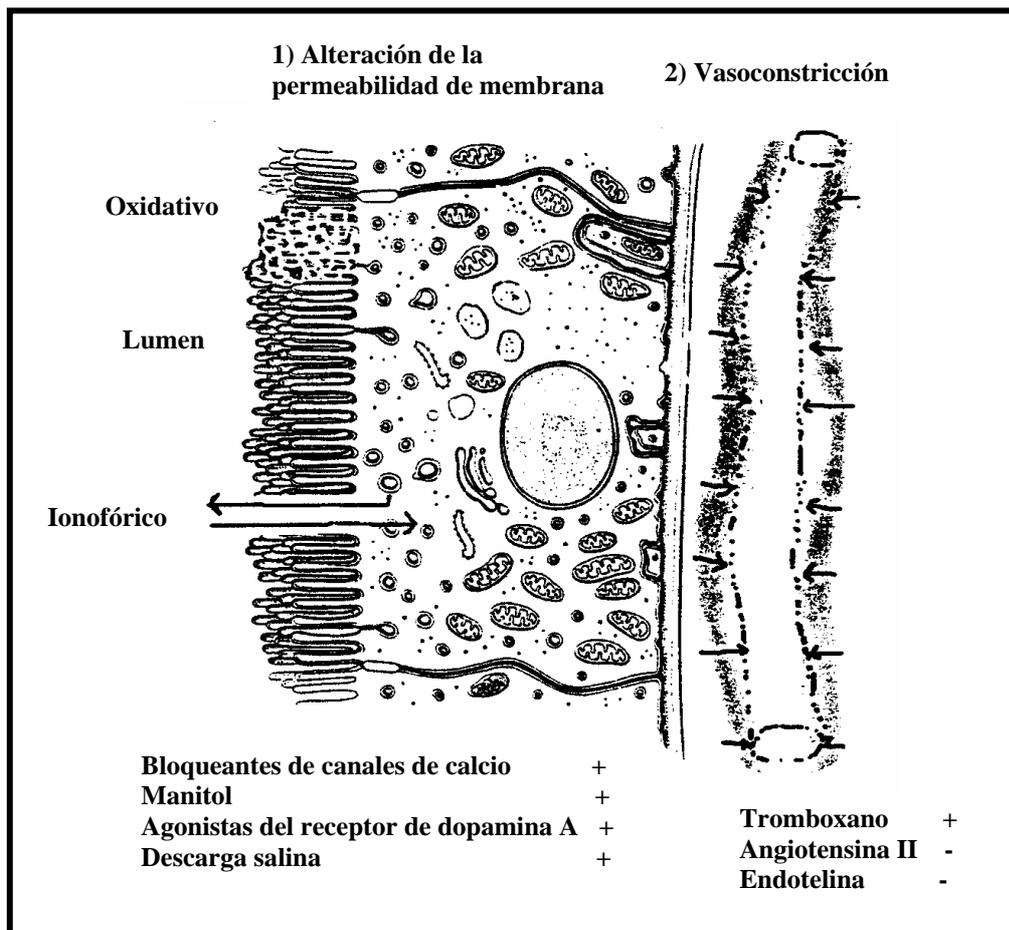


Figura 14. Principales mecanismos de nefrotoxicidad de la AmB (Fanos, V. et al. 2000).

El efecto oxidativo consiste en una autooxidación de la molécula de AmB en su región poliinsaturada y produce una peroxidación lipídica dañando la membrana celular. Este daño puede ser inhibido por antioxidantes, tales como vitamina E (Brajtburg, J. et al. 1990). El efecto ionofórico es el que causa la AmB sobre la permeabilidad de la membrana produciendo una salida del contenido celular e incrementa la captación de pequeños solutos con lo que se produce un consumo de oxígeno y cambios irreversibles que conducen a la muerte celular (Brajtburg, J. et al. 1990). El daño renal está directamente relacionado con la cantidad de AmB administrada (Miller, R. P. et al. 1969).

2. Vasoconstricción

La vasoconstricción producida por la AmB está principalmente determinada por una vasoconstricción preglomerular y podría estar relacionada con un efecto directo de la AmB sobre las células del músculo liso (Sabra, R. et al. 1990). Alternativamente, la vasoconstricción podría estar mediada por el tromboxano, mientras que la angiotensina II y la endotelina no se ven implicadas en dicho mecanismo (Ford, D. M. 1994).

Estudios realizados en ratas han demostrado que la administración de pentoxifilina incrementa la producción de prostaglandinas y esto ayuda a prevenir el daño renal (Ford, D. M. 1994). También la administración de bloqueantes de canales de calcio, agonistas selectivos del receptor de dopamina A, descarga salina y manitol pueden limitar los efectos nefrotóxicos de la AmB (Kaloyanides, G. J. 1994).

7.2. Incompatibilidades de la AmB

Debido a la gran cantidad de fármacos que presentan incompatibilidad con la AmB, se aconseja no administrarla conjuntamente con ningún otro fármaco. La mayoría de las incompatibilidades se producen por una precipitación de la AmB debido a un cambio de pH o a una rotura de la suspensión coloidal. La precipitación de la AmB se produce si se añade a la AmB una solución de cloruro sódico al 0,9 %. Algunos de los compuestos incompatibles con la AmB son: amicacina sulfato, ampicilina, bencilpenicilina, cloruro cálcico, gluconato cálcico, carbenicilina sódica, hidroclorehidrato de clorpromacina, clortetraciclina hidroclorehidrato, cimetidina, hidroclorehidrato de difenhidramina, hidroclorehidrato de dopamina, sulfato de gentamicina, kanamicina sulfato, nitrofurantoína sódica, hidroclorehidrato de oxitetraciclina, polimixina B sulfato, cloruro potásico, conservantes como alcohol bencílico, hidroclorehidrato de procaína, cloruro sódico, estreptomina sulfato, sucralfato, hidroclorehidrato de tetraciclina, hidroclorehidrato de verapamilo y vitaminas.

7.3. Efectos adversos de la AmB

Los efectos adversos de este medicamento son, en general, frecuentes e importantes, aunque se pueden evitar mediante la administración de analgésicos, heparina, antihistamínicos y antieméticos; también puede reducirse la incidencia con la administración del fármaco cada 2 días. Los efectos secundarios más característicos son:

- Frecuentemente: alteraciones digestivas (tales como anorexia, náuseas, vómitos, dispepsia, diarrea, calambres abdominales, dolor abdominal y más raramente

hemorragia gastrointestinal), renales (insuficiencia renal, acidosis tubular renal, nefrocalcinosis, anuria), alérgicas y dermatológicas (fiebre, dolor en el punto de inyección, flebitis, tromboflebitis y más raramente erupciones exantemáticas, prurito y reacciones anafilácticas), sanguíneas (anemia y más raramente hemorragias, trombocitopenia, leucopenia, agranulocitosis, eosinofilia y leucocitosis), neuropsiquiátricas (cefalea, malestar general y más raramente neuropatía periférica y convulsiones), metabólicas (hipopotasemia) y osteomusculares (mialgia y antralgia).

- Ocasional o raramente: alteraciones hepatobiliares (hepatitis, ictericia colestática, incremento de los valores sanguíneos de transaminasas y fosfatasa alcalina), cardiovasculares (arritmias cardíacas, paro cardíaco, hipertensión, hipotensión y sofocos), respiratorias (disnea, edema pulmonar, espasmos bronquiales), oculares (visión borrosa, diplopia) y otorrinolaringológicas (sordera, alteraciones del equilibrio y tinnitus).

7.4. Estrategias en la prevención de la nefrotoxicidad y los efectos adversos

La AmB es un fármaco altamente tóxico que tan sólo debe ser administrado a los pacientes que no sean hipersensibles a dicho fármaco o a los que no tengan alterada la función renal. Durante la administración de AmB el paciente debe ser monitorizado y controlar como mínimo el nitrógeno uréico en sangre y la creatinina sérica en días alternos durante la terapia, el magnesio y el potasio sérico dos veces por semana y realizar un recuento sanguíneo completo y un recuento de plaquetas semanalmente.

La mayoría de los pacientes que reciben AmB sufren alguna clase de disfunción renal, siendo los niños y neonatos los menos susceptibles a los efectos nefrotóxicos. La AmB, independientemente del tipo de formulación en la que esté incluida, debe administrarse poniendo especial atención al estado de hidratación del paciente; generalmente se suele infundir antes y después del tratamiento una solución salina (Hiddemann, W., et al. 1997).

Como se ha comentado anteriormente, durante la administración de AmB al paciente, al menos 2 ó 3 veces por semana se le deben evaluar los siguientes parámetros: nitrógeno uréico sanguíneo (BUN), creatinina, potasio, sodio y magnesio. En el caso de que los valores alcanzados en BUN o creatinina superen en 3 veces a los valores determinados antes de comenzar el tratamiento, el régimen de dosificación debe ser reajustado (Drouhet, E. et al. 1987), de manera que el tratamiento debe ser suspendido al menos durante 24 horas y, posteriormente, administrar la mitad de la dosis y seguir aumentando según nos permitan los valores de BUN y creatinina. También es aconsejable la administración intravenosa de suplementos de magnesio y potasio si sus valores están reducidos. Igualmente se ha aconsejado la administración concomitante de dopamina y furosemida con el fin de prevenir mayores efectos tóxicos (Ford, D. M. 1994, Camp, M. J. et al. 1998).

El uso de sales tan sólo ha mejorado el daño renal en humanos (Butler, K. M. y cols. 1990), y la administración intravenosa de sodio se ha demostrado que mejora y ayuda a prevenir alteraciones en la función renal. Los efectos colaterales asociados a la infusión intravenosa tales como fiebre, escalofríos, hipotensión, náuseas y vómitos pueden ser prevenidos o reducidos disminuyendo la velocidad de infusión (Richardson, M. D. et al. 1997).

Para reducir la fiebre se puede administrar tras la infusión endovenosa de AmB antipiréticos como aspirina, paracetamol o ibuprofeno, antihistamínicos como difenhidramina también puede ser útil la administración de hidrocortisona antes o durante la infusión con AmB. En caso de vómitos puede ser necesaria la administración de antieméticos.

Los últimos estudios relacionados con la reducción de la nefrotoxicidad causada por la terapia prolongada de AmB han demostrado que el uso de espironolactona reduce los requerimientos de potasio y previene la aparición de hipocalcemia en pacientes neutropénicos tratados con AmB (Ugur, U. A. et al. 2002).

7.5. Efectos de la AmB en ensayos clínicos de laboratorio

A continuación se describen los metabolitos, enzimas o parámetros clínicos cuyo valor fisiológico se ve modificado con el uso de la AmB y que tienen un significado clínico muy importante a la hora de detectar posibles efectos adversos asociados al uso de AmB:

1. Alanina aminotransferasa. Varios estudios han demostrado que tras la administración de AmB, se produjeron como efectos secundarios daños hepáticos por vasoconstricción, ictericia, hepatitis y fallo hepático agudo, lo que provocaba un incremento fisiológico en suero de esta enzima (Campo, C. et al. 1999).
2. Fosfatasa alcalina. Debido a los efectos secundarios provocados por la administración de AmB tales como hepatitis, o fallo hepático agudo, se produce un incremento fisiológico en suero de esta enzima.
3. Aspartato aminotransferasa. Se produce un incremento fisiológico en suero cuando aparecen como efectos secundarios tras la administración de AmB fallo hepático agudo, hepatitis, ictericia o daños hepáticos debidos a una vasoconstricción.
4. Bilis. Se produce un incremento fisiológico de bilis en orina cuando la AmB produce como efecto secundario daños hepatotóxicos.
5. Bilirrubina. Se ha demostrado que niveles de AmB superiores a 96 mg/l tras un tratamiento prolongado con dicho fármaco, cuando las concentraciones terapéuticas son de 3,7 mg/l, producen un incremento de la bilirrubina en suero, como consecuencia de un daño renal agudo o por hepatitis. En un ensayo clínico realizado con 556 pacientes tratados con AmB, 4% tuvo hiperbilirrubinemia. Este incremento puede causar una disfunción hepatocelular (Chariot, J. et al. 1968, Walsh, T. J. et al. 1998).
6. Amilasa. Se produce un incremento fisiológico en suero. Algunos autores han mencionado la hiperamilasemia como un efecto secundario producido tras la administración de AmB.
7. Calcio. Se produce una disminución fisiológica en suero que se ha descrito como efecto secundario tras la administración de AmB (Mc Chesney, J. A et al. 1964).
8. Cristales. Se produce un incremento fisiológico en orina y puede producirse cilindruuria. En casos de administración de dosis elevadas de AmB o tratamientos muy prolongados, pueden aparecer en orina cristales granulares e hialinos.

9. Colesterol. Con concentraciones que superan los 96 mg/l de AmB en sangre, (la concentración terapéutica de la AmB es de 3,7 mg/l), se observa un incremento en suero del colesterol. Estos incrementos en colesterol plasmático se midieron por el método de Liebermann-Burchard (Kim, E. et al. 1969, Gupte, R. D. 1968).

10. El color de las heces. Varios estudios publicados han descrito el color negruzco que presentan las heces tras la administración oral de AmB (Santangelo, R. et al. 2000, Robbie, G. et al. 1999).

11. Creatinina kinasa. Se produce un incremento fisiológico en suero. Debido a hipocalemias severas producidas tras la administración de AmB se puede producir rabdomiolisis.

12. Creatinina. Se produce un incremento fisiológico en suero. Este incremento es de 1,5 mg/dl en 24 pacientes (83%) desde 1 mg/dl tras la administración de AmB en 29 pacientes (Butler, W. T. et al. 1964). Este efecto nefrotóxico se produce tras la administración de AmB durante varias semanas, y es reversible siempre que la cantidad de AmB administrada no supere los 4 g (Beard, H. W. et al. 1960, Yates, J. L. et al. 1960, Seabury, J. H. 1961). Puede producirse azotemia como efecto adverso asociado a una disminución de la función renal. También puede aparecer nefrocalcinosis y acidosis renal tubular (Hill, G. J. H. et al. 1962, Berman, L. B. et al. 1963, Reynolds, E. S. et al. 1963, Wertlake, P. T. et al. 1963). En un ensayo clínico realizado con 556 pacientes tratados con AmB, el 11% presentaron concentraciones elevadas de creatinina en suero. En otro estudio realizado con 22 pacientes que habían sido sometidos a un trasplante de médula ósea y recibían administración simultánea de AmB y ciclosporina A, se observó que en dichos pacientes se presentaba un incremento de nefrotoxicidad (VanOmmen, R. A. 1974, Ringden, O. et al. 1994, Walsh, T. J. et al. 1998).

13. Aclaramiento de creatinina. Se produce una disminución fisiológica en orina de más del 36% debido al efecto nefrotóxico producido por la AmB. En un estudio realizado en 10 pacientes a los que se les administraba AmB, tras 2 semanas se observó una disminución del aclaramiento de creatinina desde 94 ml/min a 69 ml/min (Mc Curdy, D K. et al. 1968).

14. Eosinófilos. Se produce un incremento fisiológico sanguíneo. La eosinofilia y las discrasias sanguíneas se han considerado por varios autores como efectos secundarios.

15. Eritrocitos. Se produce una disminución fisiológica en sangre que aparece tras varias semanas de tratamiento con AmB debido a interferencias con la producción eritrocitaria (Brajtburg, J. et al. 1985). Está asociada a una depresión medular con anemia hemolítica (Beard, H. W. et al. 1960).

16. Eritropoyetina. Se produce un descenso fisiológico sérico y como consecuencia de este descenso se produce anemia en pacientes a los que se administra AmB (Brandiss, M. W. 1964, Lin, A. C. et al. 1990).

17. Tasa de filtración glomerular. En un alto porcentaje de pacientes se produce un descenso fisiológico de producción de orina (Rhoades, E. R. et al. 1961).

18. Glucosa. Se ha descrito como efecto secundario tras la administración de AmB estados tanto de hiper como de hipoglucemia.
19. γ -glutamyltransferasa. Se produce un incremento fisiológico en suero debido a hepatitis, ictericia, fallo hepático agudo y vasoconstricción hepática asociada al tratamiento con AmB.
20. Granulocitos. Se produce una disminución fisiológica en sangre. La agranulocitosis ha sido descrita como efecto secundario por algunos autores.
21. Hematocrito. Se produce un descenso fisiológico en sangre relacionado con depresión medular y anemia hemolítica (Miller, R. P. et al. 1969).
22. Hemoglobina. La anemia normocítica y normocrómica se puede desarrollar como efecto secundario. Se produce un descenso en sangre en pacientes recibiendo AmB en un 18-35% (Yu, B. G. et al. 1998, Salama, A. et al. 1989). En un ensayo clínico realizado con 556 pacientes tratados con AmB a un 5% se le diagnosticó anemia (Brandriss, M. W. 1964, Walsh, T. J. et al. 1998).
23. Isocitrato deshidrogenasa. Se produce un incremento fisiológico en suero debido a la alteración de la función hepatocelular.
24. Lactato deshidrogenasa. Se produjo un incremento fisiológico en suero en un paciente con leucemia mieloide aguda tratado con dosis elevadas de AmB, esto pudo ser una respuesta idiosincrásica.
25. Leucocitos. Se produce un descenso o un incremento en sangre presentando como posible complicación ocasional del tratamiento con AmB, leucopenia, agranulocitosis o leucocitosis. Se han publicado casos en los que pacientes recibiendo AmB han presentado discrasias sanguíneas.
26. Magnesio. Se produce una disminución fisiológica en sangre. La hipomagnesemia aparece como efecto secundario asociado a los efectos tóxicos del tratamiento con AmB (Burgess, J. L. et al. 1972). También se produce un incremento fisiológico en orina tras una infusión iv durante 2 horas. Este incremento llega a ser significativo a las 4 semanas de tratamiento.
27. Metotrexato. Se produce un incremento fisiológico en suero. La administración de AmB junto con metotrexato incrementa su semivida de eliminación y el AUC.
28. Mioglobina. Se produce un incremento fisiológico en orina provocado por rhabdomiolisis.
29. Nitrógeno no proteico. Se produce un incremento fisiológico en suero debido al efecto nefrotóxico de la AmB (VanOmmen, R. A. 1974).
30. Sangre en heces. Se han descrito casos de pacientes que presentaban gastroenteritis hemorrágica y melenas tras la administración oral de AmB.
31. pH. Se produce un descenso fisiológico en sangre. La acidosis se considera un efecto secundario de la administración de AmB. Sin embargo en orina se produce un

incremento del pH como consecuencia de la disminución de la tasa de filtración glomerular.

32. Plaquetas. Se produce un descenso fisiológico en sangre. La trombocitopenia ha sido descrita como efecto secundario tras el tratamiento con AmB. En un ensayo clínico con 556 pacientes tratados con AmB, 5% presentaron trombocitopenia.

33. Potasio. Se produce un descenso fisiológico en suero. La hipocaliemia se potencia con el uso concomitante de corticoesteroides y corticotropina y potencia el efecto tóxico de los digitálicos. La hipocaliemia surge como efecto secundario debido al efecto nefrotóxico que aparece tras varias semanas de tratamiento con AmB, generalmente reversible si no se excede la concentración de AmB en 4 g (Burgess, J. L. et al. 1972). También se han descrito casos de hipercaliemia asociados a daños renales.

34. Aclaramiento de potasio. Se produce un incremento fisiológico en orina. La dosis está relacionada inversamente con la tasa de filtración glomerular (Burgess, J. L. et al. 1972).

35. Sodio. Se produce un descenso fisiológico en suero, también relacionado con el efecto nefrotóxico que causa el uso de AmB (Butler, W. T. et al. 1964).

36. Nitrógeno uréico en sangre. Se produce un incremento fisiológico relacionado con un fallo renal agudo, anuria y oliguria producidos tras la administración de AmB. Con el fin de evitar daños renales mayores y cuando las concentraciones de nitrógeno uréico en sangre superan los 50 mg/100 ml, se suprime el tratamiento (Miller, R. P. et al. 1969).

37. Aclaramiento de ácido úrico. Se produce un incremento fisiológico en orina que está inversamente relacionado con la tasa de filtración glomerular.

7.6. Toxicidad de las nuevas formulaciones lipídicas de AmB

En general todas las nuevas formulaciones lipídicas de AmB han resultado ser menos tóxicas que la AmB en forma de deoxicolato sódico, aunque se han descrito casos en los que los pacientes han desarrollado distintos efectos adversos a estas formulaciones como anafilaxia, toxicidad cardíaca y fallo respiratorio y por lo tanto a pesar de la nefrotoxicidad producida por la AmB en forma de deoxicolato sódico, se ha considerado el fármaco de elección (Bishara, J. et al. 2001). También se han citado casos de alergia tanto en adultos como en niños a los componentes de las formulaciones lipídicas que impiden su uso en estos pacientes debiendo ser utilizada la formulación convencional (Tollemar, J. et al. 1993, Cesaro, S. et al. 1999).

De las tres nuevas formulaciones lipídicas de AmB, la AmB liposomal, siendo la más cara, es la que se considera menos nefrotóxica y la única formulación aprobada para el tratamiento de fiebre neutropénica en pacientes que no responden a la terapia antibacteriana. ABLC y ABCD tienen una toxicidad semejante aunque ABLC parece presentar menos riesgos asociados a la infusión. Por el contrario ABCD en un estudio realizado por Walsh y sus colaboradores en un tratamiento profiláctico en pacientes neutropénicos, demostró la mayor asociación de este fármaco a efectos adversos relacionados con la infusión, incluso más que con la AmB convencional, lo cual limita

enormemente su uso, mientras que la disfunción renal producida fue menor (Walsh, T. J. et al. 1999).

Existen publicaciones contradictorias en las que no queda claro si realmente la terapia con ABLC al ser usada en una dosis de 5 mg/kg/d tiene una incidencia nefrotóxica menor que la AmB convencional y por ello se deben realizar más ensayos clínicos que demuestren su eficacia y seguridad (Carrigan, C. et al. 2001).

8. ESPECTRO DE ACCION Y RESISTENCIA

8.1. Espectro de acción

La AmB se utiliza desde hace 60 años como antifúngico de elección y referencia en numerosas infecciones fúngicas (Tabla 12). Posee un espectro de acción muy elevado incluyendo hongos levaduriformes oportunistas del género *Candida*, excepto *C. lusitaniae*, los hongos dimórficos y la mayoría de los hongos micelares. Asimismo, es activa frente a los agentes de las micosis endémicas, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides Immitis* y *Paracoccidioides brasiliensis*.

Infección	Hongo	Fármaco de Elección
Aspergilosis	<i>Aspergillus</i> (generalmente <i>A. fumigatus</i>)	AmB
Blastomicosis	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Itraconazol AmB
Candidiasis	<i>Candida albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>	AmB Fluconazol
Coccidioidomicosis	<i>Coccidioides</i>	Itraconazol Fluconazol
Criptococosis	<i>Cryptococcus neoformans</i>	AmB AmB
Histoplasmosis	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Itraconazol AmB
Mucormicosis	<i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizomucor</i> , <i>Cunninghamella</i> , <i>Absidia</i>	AmB
Paracoccidioidomicosis	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Itraconazol AmB
Esporotricosis	<i>Sporothrix schenckii</i>	AmB Itraconazol
Naegleria	<i>Naegleria</i>	AmB
Leishmaniasis	Cutánea por: <i>Leishmania mexicana</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. major</i> , mucocutánea por: <i>L. braziliensis</i> , visceral por: <i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. chagasi</i>	Estibogluconato de sodio Antimoniato de meglumina AmB

Tabla 12. Fármacos de elección para las principales infecciones fúngicas y parasitarias

Los dermatofitos (*Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*) son habitualmente resistentes. También es el fármaco de elección para la terapia en pacientes con fiebre neutropénica con baja respuesta a otros agentes antibacterianos (Meyer, R. D. 1992).

La AmB también se considera un fármaco de primera elección frente a infecciones parasitarias producidas por *Naegleria*, y también se emplea, aunque no como fármaco de elección, en las infecciones parasitarias producidas por *Leishmania*. Para el tratamiento de *Candida dubliniensis*, que es una especie de *Candida* recientemente descrita y muy relacionada con *C. albicans* que se ha presentado en pacientes con sida, también ha resultado ser eficaz la AmB en la formulación convencional y en las nuevas formulaciones lipídicas (Quindos, G. et al. 2000).

Se han descrito varios casos en los que la AmB ha resultado eficaz frente a zigomicosis nasal (Wali, Y. A. y cols. 2001), frente a keratitis producida por *Fusarium solani* que pasó a causar una endoftalmitis fúngica (Goldblum, D. et al. 2000), frente a alternariosis ulcerativa cutánea (Lyke, K. E. et al. 2001) y frente a una alergia broncopulmonar causada por *Bipolaris hawaiiensis* (Saenz, R. E. et al. 2001).

8.2. Resistencia

A pesar de la amplia utilización durante décadas, no existen apenas referencias relacionadas con la resistencia a la AmB. Se han aislado cepas de *C. albicans*, que deben su resistencia a un menor contenido de ergosterol en su membrana, lo que dificulta el anclaje de la AmB y, por ello, la alteración de la permeabilidad. Estas células son, sin embargo, menos virulentas al disminuir también su capacidad de crecimiento, por lo que no tiene gran trascendencia clínica. En el laboratorio pueden obtenerse mutantes resistentes de *C. albicans*, *C. neoformans* y *Aspergillus* spp. También se han obtenido mutantes de *C. lusitaniae* y de *C. tropicalis* tras el tratamiento con AmB.

También se han encontrado cepas resistentes de *C. albicans* con elevados niveles de catalasa, lo cual confiere resistencia a la célula fúngica frente al daño oxidativo causado por la AmB.

Los resultados de los estudios de susceptibilidad obtenidos para la AmB deben ser interpretados con cautela, ya que es difícil valorar la resistencia a la AmB en estudios "in vivo" e "in vitro". Los métodos propuestos hasta ahora para realizar estudios de la susceptibilidad de la AmB "in vitro" han tenido una correlación muy pequeña con los resultados clínicos (Lozano-Chiu, M. et al. 1998). Las medidas de la mínima concentración fungicida (MFC) han resultado ser más relevantes que la mínima concentración inhibitoria (MIC).

Las dificultades de la correlación entre los estudios "in vivo" e "in vitro" se deben en parte a la dificultad de estimar la respuesta clínica a los agentes antifúngicos, particularmente dada la naturaleza multifactorial de las infecciones fúngicas en la mayoría de los pacientes inmunodeprimidos. Debido fundamentalmente a que la respuesta clínica a la AmB no está tan sólo relacionada con los estudios de susceptibilidad de la cepa infectante a la AmB "in vitro", sino también con el desarrollo clínico de la enfermedad, la persistencia de neutropenia y la existencia de catéteres u otros dispositivos protésicos (Storm, G. et al. 1997, Mills, W. et al. 1994).

8.3. Desarrollo de estudios in vivo de la eficacia de agentes antimicrobianos

Para realizar estos estudios de eficacia se considera al ratón como el animal de laboratorio de elección, debido al bajo coste económico de estos animales y a su fácil manejo. Se emplean grupos de 10 animales a los que se les infecta con el microorganismo patógeno y posteriormente se les administra el fármaco en estudio y se observa el efecto producido por el fármaco en el animal. El efecto del fármaco se puede medir fácilmente contando los animales que no mueren tras un periodo largo de tiempo o midiendo el crecimiento del microorganismo patógeno en los órganos diana del animal, determinando si el fármaco inhibe el crecimiento del microorganismo o lo mata.

Los modelos animales no se asemejan exactamente a las infecciones en humanos, ya que se emplean cepas muy virulentas para estos estudios y se emplean dosis muy elevadas de patógenos, de manera que el curso de la infección es rápido y severo. Además, los animales poseen un historial inmunológico indefinido y probablemente nunca hayan estado en contacto con el patógeno, por lo tanto carecen de anticuerpos frente a estos microorganismos. El valor de estos estudios en modelos animales es que son sistemas precisos y reproducibles para evaluar cuantitativamente la acción del antibiótico en seres vivos.

8.4. Posología de AmB

La AmB en forma de deoxicolato sódico se administra, para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas, por perfusión intravenosa en una solución de dextrosa al 5% durante 2 a 3 horas una vez al día en dosis que varían de 0,4 a 1 mg/kg. La dosis habitual del complejo lipídico de AmB (ABLCL) varía entre 3-5 mg/kg i.v. una vez al día, administrado por perfusión durante 2 horas. La dosis recomendada de AmB sulfato de colesterol (ABCD) es de 3-4 mg/kg i.v. administrados a razón de 1 mg/kg/hora una vez al día. Finalmente la dosis de AmB liposomal es de 3 a 5 mg/kg i.v. administrados durante 1 a 2 horas por perfusión intravenosa una vez al día. Estas nuevas formulaciones lipídicas están indicadas en caso de intolerancia a la AmB convencional por causa de una nefrotoxicidad excesiva, excepto AmB liposomal que también se utiliza para el tratamiento de posibles infecciones fúngicas en pacientes neutropénicos con fiebre y para el tratamiento de leishmaniosis visceral (Abramowicz, M. et al. 2001).

8.5. Eficacia de las nuevas formulaciones lipídicas de AmB

Los estudios de eficacia de formulaciones lipídicas realizados tanto en humanos como en animales de laboratorio han demostrado que dichas formulaciones poseen una eficacia semejante a la AmB en forma de deoxicolato sódico y que la ventaja farmacológica que poseen estas nuevas formulaciones es que al ser menos tóxicas pueden ser administradas en dosis mayores, (Wong-Beringer, A. y cols. 1998, Rapp, R. y cols. 1997). Aunque algunos estudios, tanto "in vitro" como "in vivo", han demostrado que la eficacia de la AmB liposomal es de 4 a 8 veces menor que la Fungizona[®], y que existe una diferencia de eficacia significativa (Pahls, S. et al. 1994).

A continuación mostramos en las Tablas 13, 14 y 15 los ensayos clínicos más importantes que se han hecho con las formulaciones de AmB de mayor uso (AmB en forma de complejos lipídicos ABLCL, AmB liposomal y AmB en forma de dispersión

coloidal ABCD) en pacientes con diversos tipos de enfermedades y diferentes infecciones fúngicas sistémicas. En todos estos estudios se ha visto cómo estas nuevas formulaciones no mejoran la eficacia de la AmB pero sí resultan ser menos tóxicas en algunos casos.

8.6 Relación concentración-efecto

Se han realizado algunos estudios con el fin de determinar las propiedades farmacodinámicas antifúngicas de la AmB. Klepser y sus colaboradores han realizado estudios de este tipo frente a *C. albicans* demostrando que la actividad antifúngica de este fármaco es dosis dependiente. Pero in vivo en la eficacia de la AmB no sólo influye la dosis sino otra serie de factores (Klepser, et al. 1997).

Las propiedades farmacocinéticas de la AmB fueron investigadas por Andes en ratones neutropénicos infectados con *Candida* (Andes, D. 1999). Se administraron dosis únicas de AmB a las dosis de 0,25, 1 y 4 mg/kg para determinar el efecto "in vivo" de distintas concentraciones de AmB. El resultado obtenido fue la cinética no lineal que tiene la AmB. Los valores de las semividas plasmáticas y el área bajo la curva (AUC) fueron respectivamente de 13,7-27 h y 9,7-83,3 mgh/l. El parámetro mejor correlacionado con la eficacia clínica fue el pico/MIC (concentración mínima inhibitoria). Los resultados obtenidos indican que el efecto letal es dependiente de la concentración "in vivo".

Anfotericina B

Referencia	Fármaco (dosis)	Duración tratamiento	Nº de pacientes	Infección	Resultado
Blau, I. W. et al. 2000	AmBisome® (1-3 mg/kg/d) vs Fungizona® (1mg/kg/d)	3 días	59 vs 134 históricos	Pacientes inmunodeprimidos con infecciones fúngicas	AmBisome® y Fungizona® eficacia semejante
Böhme, A. et al. 1996	AmBisome®(3-5 mg/kg/d) en días alternos	Varía	73 vs 72 históricos	Pacientes con neumonía granulocitopénica	AmBisome® fue eficaz
Coker, R. J. et al. 1993	AmBisome®(3 mg/kg/d) Pacientes con HIV	Media de 27 días	23	Criptococosis	AmBisome® fue eficaz
Davidson, R. N. et al. 1996	AmBisome®(3-4 mg/kg/d)	3 dosis	88 (13 4 mg/kg/d)	Leishmaniosis visceral	AmBisome® fue eficaz
Di Martino, L. et al. 1997	AmBisome®(1 mg/kg/d, 2 dosis, 3 mg/kg/d, 2, 3 o 4 dosis)	Varía	106 (11 1mg/kg/d)	Leishmaniosis visceral en niños	AmBisome® fue eficaz
Ellis, M et al. 1998	AmBisome®(4 mg/kg/d) vs Fungizona®(1 mg/kg/d)	Varía	70	Aspergillosis	AmBisome® a altas dosis no supone una ventaja
Freire, M. et al. 1997	AmBisome® (10, 14 o 20 mg/kg)	Media 5 días	32	Leishmaniosis visceral	AmBisome® fue eficaz
Heinemann, V. et al. 1995	AmBisome®(200 mg/d)	Media de 15 días	100	Candidiasis	AmBisome® fue eficaz
Juster-Reicher, A. et al. 2000	AmBisome® (2.5-7 mg/kg/d)	Media 3 semanas	24 neonatos de bajo peso	Candidiasis sistémica	AmBisome® fue eficaz
Kelsey, S. M. et al. 1999	AmBisome® (2 mg/kg/d) vs placebo	3 días por semana	161 (87 AmBisome®)	Profilaxis en pacientes neutropénicos	Eficacia semejante
Krüger, W. et al. 1995	AmBisome®(1-5 mg/kg/d)	Media de 13 días	60	Transplante de médula ósea	Resultados no muy buenos
Leenders, A. C. A. P. et al. 1997	AmBisome® (4 mg/kg/d) vs Fungizona® (0.7 mg/kg/d) en pacientes con HIV	21 días	28 (15 AmBisome®)	Meningitis criptocócica	Eficacia semejante
Leenders, A. C. A. P. et al. 1998	AmBisome® (5 mg/kg/d) vs Fungizona® (1 mg/kg/d) en pacientes neutropénicos	Varía	66 (32 AmBisome®)	micosis sistémicas	Eficacia ligeramente mejor con AmBisome®
Lorf, T. et al. 1999	AmBisome® (1 mg/kg) en pacientes con transplante de hígado	1 semana	58	Infecciones fúngicas sistémicas	AmBisome® fue bueno para prevenir
Mills, W. et al. 1994	AmBisome® en pacientes neutropénicos	Media de 12 días	133	Micosis sistémicas	AmBisome® fue eficaz
Mota-Miranda, A. et al. 1994	AmBisome®(2-3 mg/kg/d) Pacientes inmunodeprimidos	Media de 17 días	20	Micosis sistémicas	AmBisome® fue eficaz

Tabla 13. Estudios más importantes realizados sobre la eficacia de AmB liposomal en humanos.

Referencia	Fármaco (dosis)	Duración tratamiento	Nº de pacientes	Infección	Resultado
Nowoczyn, V. et al. 1992	AmBisome® (1.5-2.5 mg/kg/d)	Media de 15 días	10	Niños neutropénicos	AmBisome® fue eficaz
Prentice, H. G. et al. 1997	AmBisome®(1, 3 mg/kg/d) vs Fungizona® (1 mg/kg/d)	Varía	338 (102 Fungizona®)	Niños y adultos con fiebre neutropénica	Eficacia semejante
Ringdén, O. et al. 1991	AmBisome®(0.5-5 mg/kg/d) en pacientes inmunodeprimidos	Media de 18 días	99 (64 con infección)	Micosis sistémicas	AmBisome® fue eficaz
Ringdén, O. et al. 1994	AmBisome®(0.5-5 mg/kg/d)	Media de 15 días	15 niños	pacientes inmunodeprimidos	AmBisome® fue eficaz
Russo, R. et al. 1995	AmBisome®(4 mg/kg/d)	10 días	8	Leishmaniosis visceral	AmBisome® fue eficaz
Seaman, J. et al. 1995	AmBisome®(3-5 mg/kg/d)	3 dosis	16	Leishmaniosis visceral (<i>L. donovani</i>)	AmBisome® fue eficaz
Sohail, M. A. et al. 2001	AmBisome® vs Fungizona® (1mg/kg/d) en pacientes con HIV, diabéticos o inmunodeprimidos	Según el paciente	9	Sinusitis fúngica aguda fulminante	No se obtuvieron muy buenos resultados
Sundar, S. et al. 2001	AmBisome® (5 mg/kg/d)	46 (1 dosis), 45 (5 días)	91	Leishmaniosis visceral india	AmBisome® fue eficaz
Thakur, C. P. 1996	AmBisome®(2 mg/kg/d)	3 días	30	Leishmaniosis visceral	AmBisome® fue eficaz
Thakur, C. P. 2001	AmBisome® (15 mg/kg/d) vs Fungizona® (1mg/kg/d)	AmBisome® 1 dosis Fungizona® 20 días	34	Leishmaniosis visceral	AmBisome® fue eficaz pero de coste elevado
Tollemer, J. et al. 1993	AmBisome® (1 mg/kg/d) vs placebo	Cuando nº neutrófilos sea < 0.5 hasta > 0.5	76 (40 placebo)	Pacientes con trasplantes de médula ósea	AmBisome® fue buen profiláctico
Tollemer, J. et al. 1995	AmBisome® (1 mg/kg/d) vs placebo en pacientes con trasplante de hígado	5 días	77 (37 placebo)	Micosis sistémicas	AmBisome® fue buen profiláctico
Walsh, T. et al. 1999	AmBisome® (3 mg/kg/d, 10.8 días) vs Fungizona® (0.6 mg/kg/d, 10.3 días)	Según fármaco	687 (343 AmBisome®)	Pacientes neutropénicos con fiebre	Eficacia semejante
Walsh, T. J et al. 1995	AmBisome®(1, 2.5, 5 y 7.5 mg/kg/d)	Varía	36	Fiebre neutropénica	AmBisome® fue eficaz

Tabla 13. (Continuación) Estudios más importantes realizados sobre la eficacia de AmB liposomal en humanos.

Referencia	Fármaco (dosis)	Duración tratamiento	Nº de pacientes	Infección	Resultado
Adedoyin, A. et al. 1997	ABL C vs Fungizona® Pacientes con terapia antineoplásica y neutropénicos	Según la dosis y la enfermedad	150	Leishmaniosis mucocutánea o HIV	Tasas de supervivencia semejantes
Anaissie, E. J. et al. 1995	ABL C (5 mg/kg/d) vs Fungizona® (0,6-1 mg/kg/d)	2 semanas	231	HIV, candidiasis	Tasas de supervivencia semejantes
Cannon, J. P. et al. 2001	ABL C vs AmBisome (3-5 mg/kg/d) pacientes con fiebre neutropénica	Más de 3 días	67	Micosis sistémicas	El éxito terapéutico fue semejante en los 2 grupos
Fleming, R. V. et al. 2001	ABL C (3 mg/kg/d 10 días) vs AmBisome (4 mg/kg/d 15 días) pacientes con leucemia	Según la dosis	75	Micosis sistémicas	Ambas formulaciones igual de efectivas
Fortun, J. et al. 1999	ABL C vs AmBisome® en pacientes transplantados	Según la dosis	56	Micosis sistémicas	No se observaron diferencias significativas
Grasela, D. et al. 1993	ABL C (0,6, 1,2, 2,5 y 5 mg/kg/d) (42, 21, 10 y 5 días) vs Fluconazol (0,6 mg/kg/42d)	Según la dosis	40	Leishmaniosis mucocutánea	No descrito
Herbrecht, R. et al. 2001	ABL C (conc. Media 4.11 mg/kg/d) pacientes transplantados, con leucemia o pediátricos	Media: 38.7 días	46	Infecciones fúngicas sistémicas	ABL C fue eficaz
Hiemenz, J. W. et al. 1995	ABL C (5 mg/kg/d) vs grupo histórico de 122 pacientes con Fungizona® (500 mg)	6 semanas	151	Aspergilosis invasiva	Estudio con muchos sesgos; ABL C es eficaz
Linden, P. et al. 2000	ABL C (conc media 4.6mg/kg/d)pacientes transplantados	4 semanas	71	Micosis sistémicas	ABL C es segura y eficaz
Lister, J. 1994	ABL C (4.7 mg/kg/d) en pacientes que no responden a la Fungizona®	27 días	47	Candidiasis, aspergilosis y otras micosis	Buenos resultados de eficacia
Mehta, J et al. 1997	ABL C (5 mg/kg/d)	68 días	64	Micosis sistémicas	ABL C fue eficaz
Oravcova, E. et al. 1995	ABL C en pacientes con cáncer y desórdenes hematológicos (5 mg/kg)	1-25 días	20	Candidiasis, aspergilosis	ABL C fue efectiva
Sharkey, P. K. et al. 1991	ABL C (0.6 y 1.2, mg/kg/d) vs Fluconazol (0,6 mg/kg/d)	4 semanas	20	Coccidioído micosis	Buenos resultados de eficacia
Sharkey, P. K. et al. 1996	ABL C (1.2, 2.5 y 5 mg/kg/d) vs Fungizona® (0,7 mg/kg/d)	6 semanas	55	HIV, meningitis criptocócica	Sin diferencias estadísticas significativas
Sundar, S. et al. 1998	ABL C (5 mg/kg/d)	1, 2 o 5 días	77	Leishmaniosis visceral	ABL C fue eficaz
Sundar, S. et al. 1999	ABL C (7.5 o 10 mg/kg/d)	2 semanas	58	Leishmaniosis visceral	ABL C es eficaz a 5 mg/kg/d
Walsh, T. J. et al. 1994	ABL C (4.9 mg/kg/d) en pacientes que no responden a la Fungizona®	39 días	228	Candidiasis, aspergilosis y otras micosis	Buenos resultados de eficacia
Walsh, T. J. et al. 1998	ABL C (5mg/kg/d o 3 mg/kg/d)	4 semanas	556	Micosis sistémicas	ABL C fue efectiva con 3 mg/kg/d
Wingard, J. R. et al. 2000	ABL C (5mg/kg/d) vs AmBisome® (3 y 5 mg/kg/d) pacientes neutropénicos	Máximo 6 semanas	244	Micosis sistémicas	El éxito terapéutico fue semejante en los 2 grupos

Tabla 14. Estudios más importantes realizados sobre la eficacia de complejos lipídicos de AmB (ABL C) en humanos.

Referencia	Fármaco (dosis)	Duración tratamiento	Nº de pacientes	Infección	Resultado
Amantea, M. A. et al. 1995	ABCD (0.5-8 mg/kg/d) pacientes con trasplante de médula ósea	4 semanas	75	Micosis sistémicas	Tratamiento seguro y eficaz
Anaissie, E. J. et al. 1998	ABCD (4 mg/kg/d) Pacientes con función renal alterada	6 semanas	133	Micosis sistémicas con: <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Histoplasma</i> , <i>Criptococcus</i> .	Eficacia semejante a Fungizona® pero menor toxicidad
Berman, J et al. 1999	ABCD (2 mg/kg/d)	10, 7 o 5 días	29	Leishmaniosis visceral	ABCD fue eficaz
Bowden, R. A. et al. 1996	ABCD (0.5-8 mg/kg/d) pacientes con trasplante de médula ósea	6 semanas máximo	75	Aspergillosis o candidiasis	ABCD resultó ser eficaz
Gaeta, G. B. et al. 2000	ABCD 2 mg/kg/d	1 semana	12	Leishmaniosis visceral	ABCD fue eficaz
Herbrecht, R. et al. 1999, 1997, Gurwith, M. et al. 1999, Dupont, B. 1999, Guo, L. S. et al. 2001	ABCD (Conc media 4.050 mg/kg/d) en pacientes inmunodeprimidos	Media 18 días (1-407)	572	Micosis sistémicas junto con enfermedades graves	ABCD fue eficaz
Herbrecht, R. et al. 2001	ABCD (Conc media 4.8 mg/kg/d) en pacientes inmunodeprimidos	37 días	21	Murcomicosis invasiva	ABCD junto con cirugía es eficaz
Noskin, G. et al. 1998	ABCD (3.9mg/kg/d) en pacientes inmunodeprimidos	72 días	176	Candidiasis	Tratamiento eficaz
Noskin, G et al. 1999	ABCD (4mg/kg/d) en pacientes transplantados de médula ósea	23 días de media	220	Candidiasis	Tratamiento eficaz
Oppenheim, B. A. et al. 1995	ABCD (4mg/kg/d para aspergillosis, 3 mg/kg/d para candidiasis)	18.5 días de media	168	Micosis sistémicas) en pacientes con desórdenes hematológicos	ABCD resultó ser eficaz
Sandler, E. S. et al. 2000	ABCD (5 mg/kg/d) vs Fungizona® (1mg/kg/d)	Según paciente	49 niños	Pcientes con fiebre neutropénica	ABCD fue eficaz
Timmers, G. J. et al. 2000	1º ABCD (2mg/kg/d i.v.) o 1º Fluconazol (200 mg/d oral) 2º ABCD (4 mg/kg/d)	ABCD 13.9 días Fluconazol 21.2 días	24	Pacientes neutropénicos	ABCD no fue adecuado para profilaxis antifúngica
White, M. H. et al. 1996	ABCD (4 mg/kg/d) vs Fungizona® retrospectivo (0.8 mg/kg/d) Pacientes con trasplantes de médula ósea	Varía	101 ABCD 93 Fungizona®	Pacientes con fiebre neutropénica	Ambos tratamientos igualmente eficaces
White, M. H. et al. 1997	ABCD (0.5-8 mg/kg/d) vs Fungizona® retrospectivo (0.1-1.4 mg/kg/d) Pacientes con trasplantes de médula ósea	23.5 días ABCD 22 días Fungizona®	82 ABCD 261 Fungizona®	Aspergillosis invasiva	ABCD respuesta muy semejante a Fungizona®
White, M. H. et al. 1998	ABCD (4 mg/kg/d) vs Fungizona® (0.8 mg/kg/d)	≤ 14 días	213	Pacientes con fiebre neutropénica	ABCD fue eficaz

Tabla 15. Estudios más importantes realizados sobre la eficacia de dispersiones coloidales de AmB (ABCD) en humanos.

PARTE EXPERIMENTAL

ESTUDIO ANALÍTICO DEL PRINCIPIO ACTIVO

1. MATERIALES EMPLEADOS

La anfotericina B (AmB) y la nistatina pulverizada empleada fueron suministradas por Squibb Pharmaceutical Industry (Barcelona, España); la anfotericina B USP estándar por (Dumex[®] LTD, Dinamarca); el metanol para HPLC por Lab-Scan (Irlanda); el dimetilsulfóxido (DMSO) y el acetonitrilo por Panreac (Barcelona, España); el etilendiamino-tetraacético disódico (EDTA) por Sigma-Aldrich (Barcelona, España); y el plasma para la validación se tomó de conejos sanos. El agua utilizada fue doblemente desionizada por un sistema de purificación de agua modelo Milli-Q (Millipore, EEUU).

2. ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS

Esta técnica se ha utilizado en los análisis rutinarios del principio activo por su comodidad y rapidez. Para su realización se empleó un equipo Beckman DU-6.

Método

Se preparó una solución de AmB en DMSO con una concentración de 1 mg/ml. Posteriormente se tomó una alícuota de dicha solución y se diluyó en metanol hasta obtener una concentración final de 5 µg/ml, sobre la que se realizó un barrido espectrofotométrico en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 200 y 600 nm, a una velocidad de barrido de 300 nm/min, y empleando una cubeta de 1cm de paso óptico.

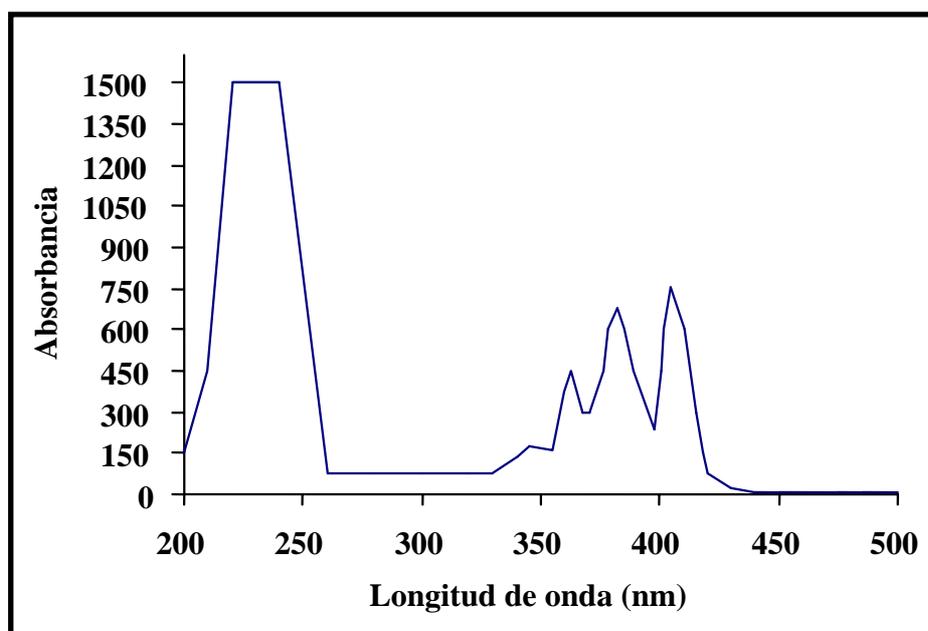


Figura 15. Espectro de absorción UV/VIS de la AmB en DMSO/metanol.

Resultados

El espectro de absorción UV/VIS de la AmB se observa en la Figura 15 y muestra picos de absorción a la longitud de onda de 405, 382, 363 y 344 nm, siendo el máximo de absorción el pico correspondiente a una longitud de onda (λ) de 405 nm; dicha longitud de onda fue la seleccionada para el desarrollo de los métodos cuantitativos de análisis, tanto espectrofotométricos como cromatográficos, utilizados en este trabajo de investigación.

3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA (HPLC)

Se puso a punto un método analítico para la identificación y cuantificación de la anfotericina B en los ensayos de estabilidad realizados a las microemulsiones y en los estudios farmacocinéticos realizados en conejos. Dicho método está basado en el desarrollado por Brassine, C. y sus colaboradores con algunas modificaciones realizadas para esta Memoria (Brassine, C. et al. 1987). Muchos métodos han sido descritos para la cuantificación del principio activo por HPLC, como vemos en la Tabla 16, modificando tanto la fase móvil como la longitud de onda o el flujo de la fase móvil, pero el método elegido resultó ser el de mayor límite de detección, menor tiempo de retención y presencia de EDTA en la fase móvil, ya que varios autores han publicado que en ausencia de EDTA los picos de AmB no son ni cuantitativos ni reproducibles (Brassine, C. et al. 1987). Estos factores son de importante consideración a la hora de trabajar con muestras biológicas.

Referencia	Columna	Fase móvil	λ (nm)	Límite de detección ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo de retención (min)	Flujo (ml/min)
Alak, A. et al. 1996	Alltima ODS 316 (250 x 4,6 cm, 5 μm)	Acetonitrilo: agua con 0,05 N de acetato sódico anhidro (34:66 v/v)	406	0,05	8,4	1
Bach, P. R. et al. 1984	Ultrasphere-ODS FR (15 cm x 4,6 mm ID, 5 μm)	Acetonitrilo, metanol y 5mM EDTA (187:449:354 v/v)	386		6,31	1,5
Betto, P. et al. 1997	MICRA-NPS C18 FR (33 x 4,6 mm ID, 1,5 μm)	0,05M acetato sódico- acetonitrilo-metanol (40:30:30 v/v)	382	0,125	3	0,7
Brassinne, C. et al. 1987	μ Bondapak C18 (30 cm x 3,9 mm ID, 10 μm)	Metanol-acetonitrilo- 0,0025M EDTA (500:350:200, v/v/v)	405	0,01	6	1,6
Campanero, M. A. et al. 1997	Nucleosil C18 (120 x 4 mm ID, 5 μm)	Acetonitrilo – agua - ác acético (44:51:5, v/v)	407	0,001	4,2-4,4	1
Christiansen, K. et al. 1985	Octilsilano FR -8 (10 μm , 250nm)	Buffer acetato (0,01M, pH 4) y metanol	407	0,05	8,77	2
Echevarría, I. et al. 1998	Ultrabase C18 FR (250 x 4,6 mm I.D, 5 μm)	Acetonitrilo- ác, acético (10%)- agua (41:43:16 v/v)	405	0,01	6	1

Tabla 16. Métodos cromatográficos para la determinación y cuantificación de AmB.

Referencia	Columna	Fase móvil	λ (nm)	Límite de detección ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo de retención (min)	Flujo (ml/min)
Golas, C. L. et al. 1983	μ Bondapack C18 FR (30 x 0,4cm, 10 μm)	Acetonitrilo - tampón acetato sódico acuoso, 10 mM, pH 7, (40:60, v/v)	405	-	10	1,5
Granich, G. G. et al. 1986	μ Bondapack C18 FR (3,9 mm x 30 cm)	Acetonitrilo y 0,01M EDTA (pH 4,2; 40:60 v/v)	408	0,04	4,9 \pm 0,8	1,5
Hosotsubo, H. et al. 1989	CLC-C8 columna FR (15 cm x 6 mm ID, 5 μm)	Acetonitrilo (60:40 v/v) - tampón acetato sódico acuoso 0,01M, pH 7,4	405	0,01	6,6	-
Hülsewede, J. et al. 1994	Lichrosphere 100 C18 FR (250 x 4 mm, 5 μm)	Metanol - tampón fosfato (10 mM y 5 mM EDTA-Na ₂) pH4 (40:60 v/v)	405		1-6,8 \pm 0,5 2-12,5 \pm 0,5	
Lacroix, C. et al. 1995	Ultrasphère C18 FR (75 x 4,6 mm ID, 3 μm)	Metanol y agua (74:26 v/v) + 0,002 M octano sulfonato sódico, pH4,5	405	-	3,6	1
Lue, L. P. et al. 2002	pBondapack C18 FR	Acetonitrilo-agua-ácido acético (40:54:6, v/v)	405	0,01	12,4	1,8
Mayhew, J. W. et al. 1983	Ultrasphere-ODS FR (15 cm x 4,6 mm ID, 5 μm)	50% metanol en 0,01M EDTA (6min) 50% acetonitrilo en 0,01M EDTA(1min)	388	0,04	19	1
Moreno, M. A. et al. 1998	Spherisorb C18 FR (200 x 4,6 mm ID, 5 μm)	Metanol - EDTA 0,005 M (80:20 v/v)	405	-	5	1,8
Ng, T.K.C. et al. 1996	Nova-Pak C18 FR (100 x 8mm, 4 μm)	Acetonitrilo-10mM:acetato amónico (30:70 v/v) con 0,5% dietilamina	405	0,313	10,21	-
Polikandritou, M. et al. 1996	μ Bondapack C18 FR (0,39 x 30 cm)	Acetonitrilo - buffer acetato 10mM, pH4 (37:63 v/v)	383	0,1	14	1,5
Wang, L. H. et al. 1992	μ Bondapack C18 FR (300 x 3,9 mm I.D,10 μm)	45% acetonitrilo en 2,5 mM Na ₂ EDTA	382	0,005	6-7	1

Tabla 16. (Continuación) Métodos cromatográficos para la determinación y cuantificación de AmB.

Para llevar a cabo el análisis se utilizó un cromatógrafo de líquidos HP serie 1050 con detector UV/VIS serie 1050 e integrador HP serie 3396 y, como fase estacionaria, una columna Luna C18 de 150 x 4,6 mm y 3 μ de tamaño de poro interno con una guarda columna SecurityGuard® C18 (ODS, octadecil) de 4 x 3 mm estable a un pH entre 1,5 y 10 de Phenomenex.

Método

A) En metanol. Se preparó una solución de AmB en DMSO con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. A continuación se tomó una alícuota de dicha solución y se diluyó con metanol hasta obtener una solución del principio activo con una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Dicha

solución se pasó por un filtro de membrana de nylon con un tamaño de poro de 0,45 μm , inyectándose en el cromatógrafo un volumen de 20 μl .

B) En plasma. Se preparó una solución de AmB en DMSO con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. A continuación se tomó una alícuota de dicha solución y se diluyó con metanol hasta obtener una solución del principio activo con una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$. Se tomaron 2 ml de esta solución y se les añadió 1 ml de plasma de conejo. La mezcla se agitó y se centrifugó a 5500 rpm durante 20 minutos con el fin de precipitar las proteínas plasmáticas y se inyectó el sobrenadante en el HPLC con una concentración de AmB de 1,33 $\mu\text{g/ml}$.

Para ambos métodos se utilizó como fase móvil una mezcla de metanol-acetonitrilo-0.0025M EDTA sódico en una proporción 40:30:30 v/v/v, manteniéndose un flujo de 1 ml/min. La longitud de onda del detector se fijó en 405 nm, que es el máximo de absorción de la AmB.

Resultados

Los resultados obtenidos en ambos métodos muestran un pico de AmB con un tiempo de retención de aproximadamente entre 5 y 6 minutos, claramente separado del frente y del pico de anfotericina A sin interferencias (Figuras 16 y 17). Se observó también una diferencia clara entre el cromatograma de AmB en metanol y en plasma, ya que este segundo cromatograma presenta un desdoblamiento del pico de AmB, este detalle también ha sido descrito por otros autores (Sánchez-Brunete, J. A. et al. 2001).

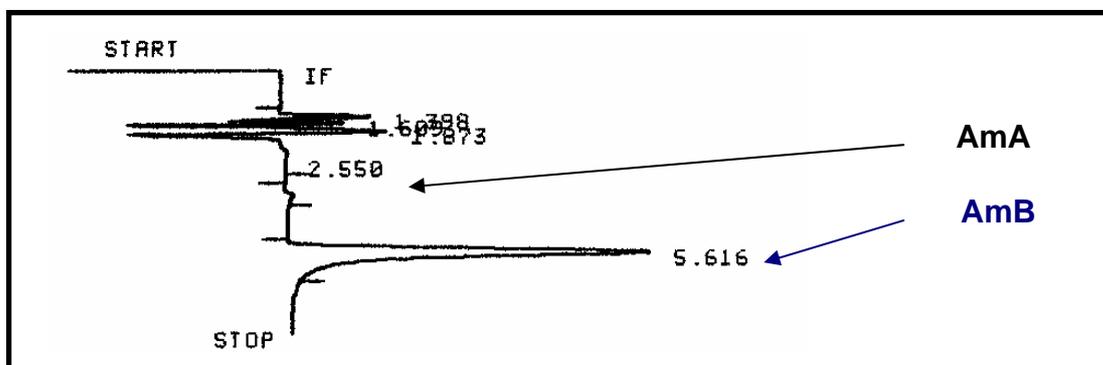


Figura 16. Cromatograma de la AmB en metanol.

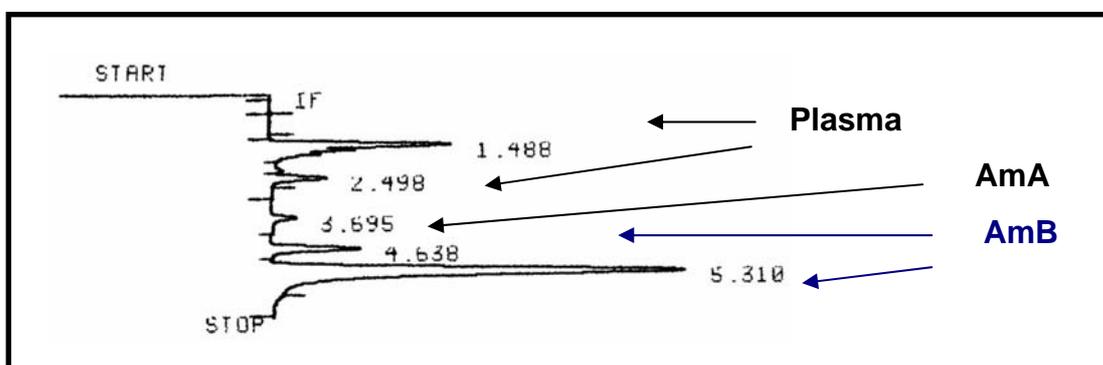


Figura 17. Cromatograma de la AmB en plasma.

4. VALIDACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Es la demostración documentada de que los parámetros que componen el método son adecuados para los requisitos de los datos analíticos.

4.1. Parámetros cromatográficos para la calibración del sistema

La calibración de un equipo consiste en un conjunto de operaciones que establecen una serie de relaciones, en unas condiciones especificadas, entre los valores indicados por un instrumento y los correspondientes valores conocidos. El objetivo fundamental de la calibración de un equipo es tener seguridad en la medida. Los parámetros cromatográficos que nos permiten caracterizar y definir los cromatogramas y calibrar el sistema son los siguientes:

1. Relación o factor de capacidad (K)

Da la relación entre los tiempos de los solutos que intervienen en la fase estacionaria y en la fase móvil. Cuanto más grande sea este factor, más retenido estará el soluto por la fase estacionaria.

$$K = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Donde t_R es el tiempo de retención del principio activo, t_M el tiempo muerto que es el tiempo en el que aparece el frente de la fase móvil y t'_R es el tiempo de retención corregido. Los valores de la relación de capacidad K deben ser:

≥ 1 , con el fin de conseguir la separación del compuesto de interés, tanto del disolvente como de las posibles impurezas.

$\leq 10-15$, porque en este caso el tiempo de análisis será demasiado largo, aumentando la anchura del pico y haciendo más difícil la resolución y la detección.

2. Número de platos teóricos (n)

Este parámetro indica la eficacia de la columna, ya que cuanto más anchos sean los picos, menor número de ellos podrán resolverse en el mismo intervalo de tiempo, y por lo tanto podrán separarse menos componentes. Este parámetro viene dado por la siguiente expresión:

$$n = \frac{t_R}{\sigma^2} = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

Donde W_b es la anchura de base del pico, y W_h es la anchura del pico a media altura. La eficacia de la columna será mayor cuanto mayor sea n .

3. Altura de plato o altura equivalente a un plato teórico (HEPT) (h)

Es también un parámetro que indica la eficacia de la columna, ya que cuanto más anchos sean los picos, menor número de ellos podrán resolverse en el mismo intervalo de tiempo y, por lo tanto, podrán separarse menos componentes. A menor altura de plato mayor eficiencia de la columna.

$$h = \frac{L}{n}$$

Donde L es la longitud de la columna. Así, a mayor número de platos teóricos y menor altura de plato, mayor eficacia de la columna.

4. Factor de separación o retención relativa (α)

Describe la posición relativa de dos picos adyacentes (en nuestro caso, anfotericina A y B). Para el cálculo de este parámetro se utilizan los tiempos de retención corregidos, porque la separación de los mismos depende de la interacción selectiva con la fase estacionaria.

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

Los valores de α son siempre > 1 (cuando $\alpha = 1$ no existe separación de los picos). Este factor de separación nos informa de la posición relativa de dos picos, pero no nos informa sobre la separación real de dichos picos, que dependerá de la eficacia de la columna.

5. Resolución (R_S o R)

Se expresa como el cociente entre la distancia de los máximos de los dos picos y el valor medio de las anchuras de los picos en la base.

$$R_S = \frac{\Delta t}{\frac{W_{b1} + W_{b2}}{2}}$$

Los valores de R_S menores de 0,8 indican una resolución insuficiente. Valores superiores a 1,5 indican una separación hasta la línea de base.

Los parámetros cromatográficos que se han obtenido con nuestro equipo y columna para la anfotericina B, aparecen reflejados en la siguiente Tabla:

Parámetro	Valor	Valor aceptado
K	2,6	$10-15 \leq K \leq 1$
n	4624	
h	$4,16 \cdot 10^{-3}$	
α	1,73	≥ 1
R_S	4	$> 0,8$

Tabla 17. Parámetros cromatográficos.

5. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de los métodos analíticos es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de los atributos de calidad previamente establecidos. Es necesario validar para demostrar que los métodos son adecuados para los análisis propuestos en las condiciones descritas, porque es parte integral del desarrollo de

un método analítico, porque es necesario trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, porque resulta mucho más económico trabajar con métodos validados, y finalmente porque es de obligado cumplimiento según la norma ISO 17025.

Los parámetros de validación que se deben considerar para los métodos analíticos previamente descritos son:

1. Especificidad

El objetivo es demostrar que se alcanza el nivel discriminatorio deseado en los ensayos de:

- **Identificación:** Consiste en establecer el nivel de discriminación adecuado entre compuestos de estructuras relacionadas que puedan estar presentes. Se verifica mediante la comparación de la muestra con un estándar de referencia, debidamente caracterizado, o por comparación entre muestras que contienen el analito con otras que no lo contienen.
- **Impurezas:** Consiste en demostrar la capacidad discriminatoria del método para separar el analito en presencia de las impurezas, productos de degradación o excipientes. Se puede comprobar adicionando al analito (sustancia activa o producto medicinal) un determinado nivel de impurezas o excipientes. Se emplean cromatogramas para demostrar la separación de los componentes individuales.

2. Linealidad

Es la capacidad de un procedimiento de ensayo para dar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, en un rango del procedimiento analítico definido. Se determina por tratamiento matemático, de los resultados obtenidos en el análisis de muestras con concentraciones crecientes del analito.

3. Rango

Es el intervalo entre los niveles superior e inferior, para los que se ha demostrado que el procedimiento es adecuado en lo relativo a su precisión, exactitud y linealidad, para determinar el analito. Se calcula a partir de los estudios de linealidad.

4. Exactitud

Expresa el grado de concordancia entre el valor aceptado como verdadero y el obtenido con el procedimiento de ensayo. Da una indicación de los errores sistemáticos, y se expresa como porcentaje de recuperación o como diferencia entre el valor medio y el aceptado como verdadero, junto con los intervalos de confianza. Se puede calcular a partir de 9 determinaciones sobre, al menos, 3 niveles de concentración.

5. Precisión

Expresa el grado de concordancia o de dispersión entre una serie de medidas obtenidas de tomas múltiples de una misma muestra homogénea, utilizando el procedimiento de ensayo indicado. Da idea de los errores aleatorios, se puede realizar a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad y se expresa como la varianza, desviación estándar o coeficientes de variación de una serie de medidas.

- Repetibilidad. Expresa la precisión del procedimiento de ensayo cuando es realizado por el mismo analista en cortos intervalos de tiempo, bajo condiciones iguales en cuanto a equipos, reactivos, condiciones experimentales y condiciones ambientales. Mide variaciones intra-ensayo.
- Precisión intermedia. Se refiere a las variaciones dentro de un laboratorio, cuando el procedimiento se realiza en distintos días, analistas, equipos...
- Reproducibilidad. Expresa la precisión entre laboratorios, y se establece para los estudios de colaboración.

6. Límites de detección y cuantificación

El límite de detección de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de un analito que puede ser detectada pero no cuantificada como un valor exacto. Se determina por el análisis de muestras con concentraciones conocidas del analito, estableciendo el mínimo nivel que puede ser detectado. El límite de cuantificación se define como la concentración más baja de analito que puede determinarse cuantitativamente con aceptable precisión y exactitud.

7. Robustez

Es la capacidad del método para permanecer inalterado, bajo ligeras modificaciones en los parámetros experimentales. Pone de manifiesto la influencia que tienen pequeñas variaciones en el método sobre los resultados. Se determina introduciendo variaciones en el procedimiento y observando la respuesta.

5.1. Espectrofotometría UV/VIS

Para validar el método analítico se partió de soluciones de AmB en DMSO con una concentración de 100 µg/ml. A continuación se tomaron alícuotas de dichas soluciones y se diluyeron con metanol hasta obtener una serie de soluciones patrón con un intervalo de concentraciones comprendido entre 1 y 5 µg/ml. Dichas soluciones se valoraron mediante espectrofotometría UV/VIS a una longitud de onda de 405 nm en un equipo Beckman DU-6. De cada concentración se realizaron 3 determinaciones utilizándose en todos los casos metanol como blanco.

Especificidad

Como se observa en la Figura 18, a la longitud de onda seleccionada de 405 nm, no hay interferencias en la detección de la AmB con otros componentes de la formulación, por lo tanto el método es específico para determinar el principio activo a esa longitud de onda.

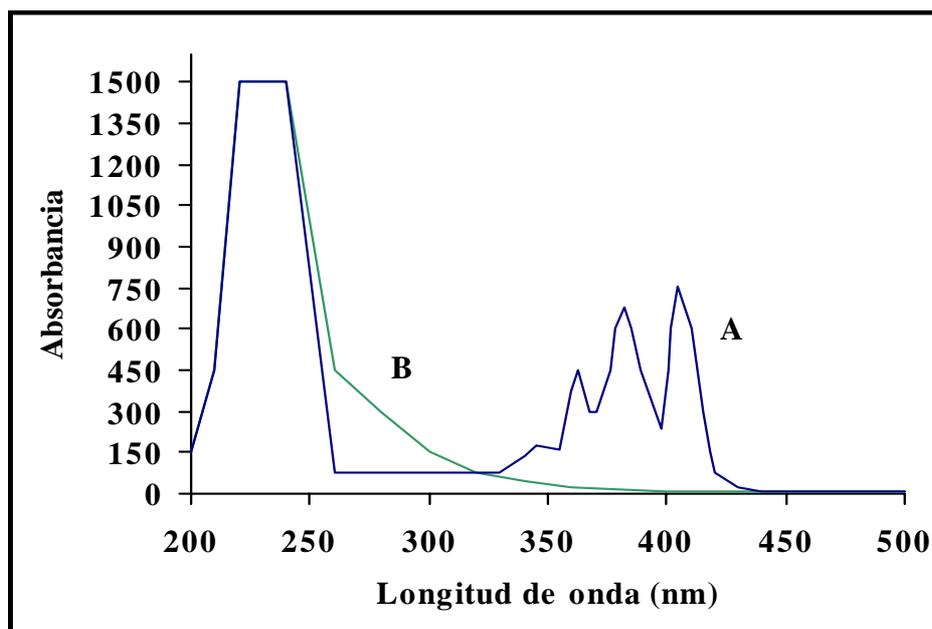


Figura 18. Espectro de absorción UV/VIS de la AmB en DMSO/metanol (A) y de Brij® 96V en metanol (B).

Con el fin de comprobar que el tensioactivo utilizado para la formulación en forma de microemulsión no interferían en el espectro de absorción de la AmB se realizó un barrido espectrofotométrico de una solución de 1 ml del tensioactivo Brij® 96V en 50 ml de metanol en el mismo intervalo de longitudes de onda y a la misma velocidad de barrido. Se pudo comprobar que el espectro de absorción del tensioactivo Brij® 96V no interfería con el de la AmB a la longitud de onda seleccionada (405 nm) para la realización de los análisis cuantitativos.

Linealidad

La recta de regresión obtenida para este método se obtuvo por el análisis de regresión por mínimos cuadrados, obteniendo un coeficiente de determinación superior a 0,99, por lo tanto el método es lineal. La ecuación de la recta de regresión y los valores de absorbancia obtenidos son:

$$\text{Abs} = 0,1533 * \text{Conc} + 0,0036$$

$$r^2 = 0,9977$$

Figura 19. Ecuación de la recta de regresión lineal y coeficiente de correlación.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia
1	0,1457
1	0,1482
1	0,1592
2	0,3045
2	0,3102
2	0,3228
3	0,4591
3	0,4653
3	0,4780
4	0,6145
4	0,6141
4	0,6432
5	0,7594
5	0,7582
5	0,7671

Tabla 18. Valores de absorbancia de distintas concentraciones de AmB.

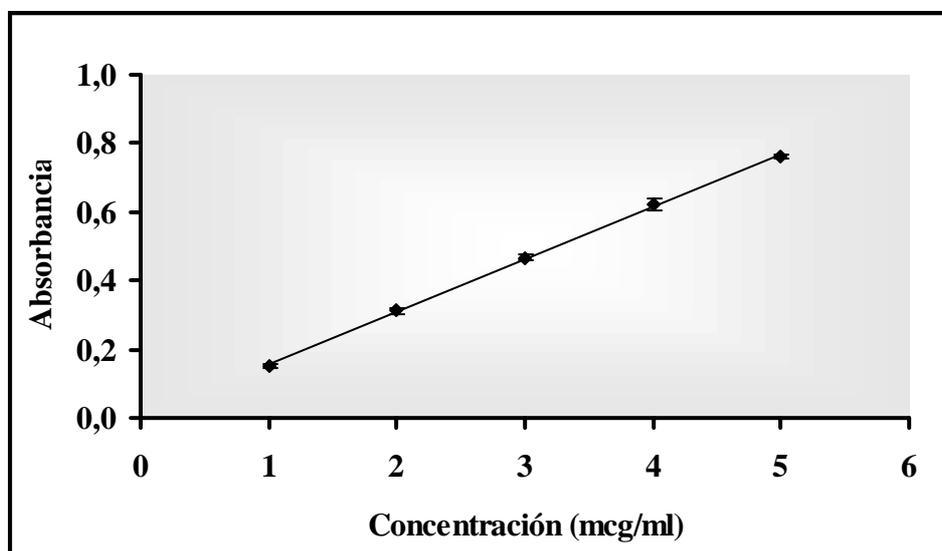


Figura 20. Recta de calibrado del método espectrofotométrico.

Los valores obtenidos para los parámetros analizados en los ensayos de linealidad se encuentran recogidos en las siguientes Tablas:

Parámetro	Valor	Valor aceptado
Factor de respuesta	0,154	
Coefficiente de variación	2,873%	< 5%
Varianza del error experimental total	$1,964 \cdot 10^{-5}$	

Parámetro	Valor	V.A.	Parámetro	Valor	V.A.
Valor de b	0,1533		Valor de a	0,0036	
Varianza de b	$3,920 \cdot 10^{-8}$		Varianza de a	$4,312 \cdot 10^{-7}$	
Desviación estándar de b	0,002		Desviación estándar de a	0,006	
Desviación estándar relativa de b	0,129%	< 2%	Desviación estándar relativa de a	18,241%	
Límite superior de confianza	0,1573		Límite superior de confianza	0,0159	Incluye el 0
Límite inferior de confianza	0,1486		Límite inferior de confianza	$-9,96 \cdot 10^{-3}$	
Test estadístico de b	75,555	> 2,145	Test estadístico de a	0,527	< 2,145

(V. A. = valor aceptado)

Tabla 19. Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal: $y = a + b x$.

A la vista de estos resultados podemos concluir que el método es lineal dentro del rango de concentración utilizado, ya que los valores se encuentran dentro de los límites especificados, y además es un método proporcional, puesto que la recta pasa por el origen de coordenadas.

Precisión

- Repetibilidad. A partir de seis soluciones de una concentración de 3 µg/ml se procedió a su lectura en condiciones experimentales análogas. Se calculó el coeficiente de variación, resultando siempre inferior al 5%.

$$CV = 2,077\%$$

- Precisión intermedia. Se analizaron tres soluciones durante tres días consecutivos. Al calcularse el coeficiente de variación se observó que fue inferior al 5%.

$$CV = 3,032\%$$

Exactitud

En el test de homogeneidad de varianzas, mediante la aplicación del test de Cochran, con respecto a los porcentajes de recuperación se obtiene una $C_{exp} = 0,3549$ y una $C_{tab} = 0,6838$, con lo que se puede concluir que hay homogeneidad de varianzas. En el test de validez de medias por el análisis de ANOVA para los porcentajes de recuperación se obtiene una $F_{exp} = 1,52$ y una $F_{tab} = 3,48$, por lo que se puede concluir que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación. El intervalo de confianza de la recuperación media es de 97,76 a 101,25; es un valor aceptable por estar incluido en el rango el valor de 100.

Rango

El intervalo entre los niveles superior e inferior para los que se ha demostrado que el procedimiento es adecuado en lo relativo a su exactitud y linealidad se encuentra entre los valores de concentración de 1 a 5 $\mu\text{g/ml}$.

5.2. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) en metanol

Para validar el método analítico se partió de soluciones de AmB en DMSO con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. A continuación se tomaron alícuotas de dicha solución y se diluyeron con metanol hasta obtener una serie de soluciones patrón con un intervalo de concentraciones comprendido entre 0,05 y 2 $\mu\text{g/ml}$. De cada concentración se efectuaron tres determinaciones.

Especificidad

El método analítico cumple esta condición como se puede observar en los cromatogramas donde el pico de la AmB es definido y nítido en comparación con un cromatograma que no contiene AmB (Figura 21).

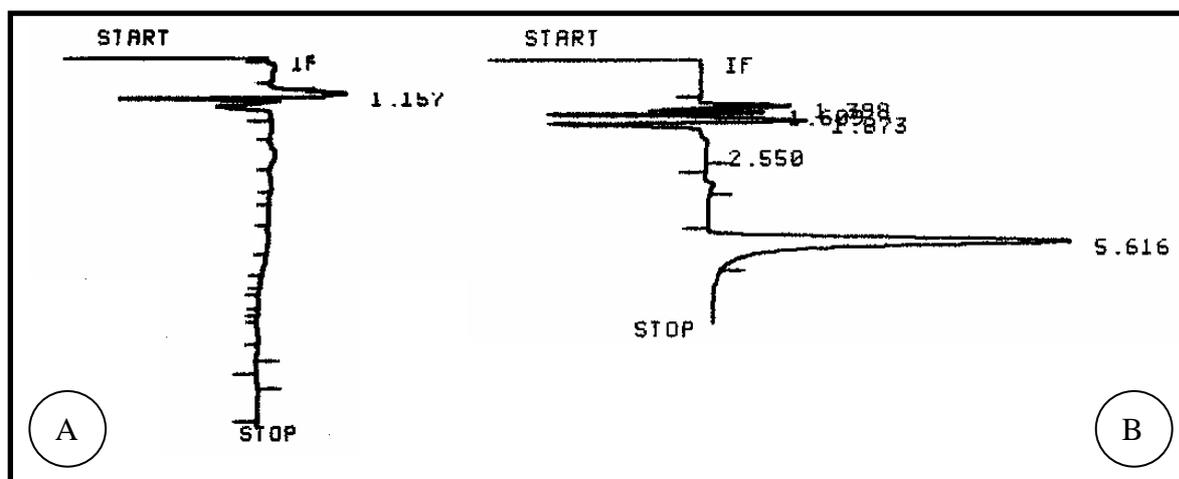


Figura 21. Cromatograma de una microemulsión sin principio activo (A) y de una microemulsión con principio activo (B) en metanol.

Linealidad

La recta de regresión obtenida por este método se obtuvo por el análisis de regresión por mínimos cuadrados, obteniendo un coeficiente de determinación superior a 0,99, por lo tanto el método es lineal. Los valores de áreas obtenidos y la ecuación de la recta de regresión son:

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Área
0,5	269550
0,5	253684
0,5	257689
1	511829
1	518639
1	494760
2	975889
2	964002
2	956307
3	1426649
3	1509865
3	1440028
4	2044338
4	1901146
4	1952001

Tabla 20. Valores de área de distintas concentraciones de AmB.

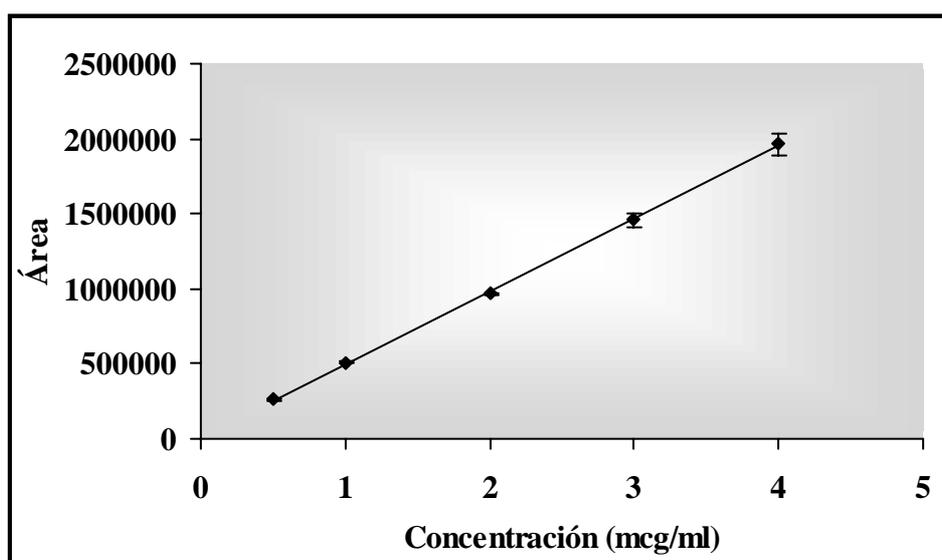


Figura 22. Recta de calibrado del método cromatográfico.

$$\text{Abs} = 484304 \cdot \text{Conc} + 15532$$

$$r^2 = 0,9996$$

Figura 23. Ecuación de la recta de regresión lineal y coeficiente de correlación.

Los valores obtenidos para los parámetros analizados en los ensayos de linealidad se encuentran recogidos en las siguientes Tablas:

Parámetro	Valor	Valor aceptado
Factor de respuesta	498446,504	
Coefficiente de variación	3,766%	< 5%
Varianza del error experimental total	3,524.10 ⁸	

Parámetro	Valor	V.A.	Parámetro	Valor	V.A.
Valor de b	484304		Valor de a	15532	
Varianza de b	4,826.10 ⁷		Varianza de a	2,767.10 ⁸	
Desviación estándar de b	6949,2		Desviación estándar de a	16640,9	
Desviación estándar relativa de b	1,434%	< 2%	Desviación estándar relativa de a	117,303%	
Límite superior de confianza	499210,0		Límite superior de confianza	51226,73	
Límite inferior de confianza	469397,9		Límite inferior de confianza	-20162,73	Incluye el 0
Test estadístico de b	69,692	> 2,145	Test estadístico de a	0,9333	< 2,145

(V. A. = valor aceptado)

Tabla 21. Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal: $y = a + b x$.

A la vista de estos resultados podemos concluir que el método es lineal dentro del rango de concentración utilizado, ya que los valores se encuentran dentro de los límites especificados, y además es un método proporcional, puesto que la recta pasa por el origen de coordenadas.

Precisión

- Repetibilidad. A partir de tres soluciones de trabajo de una concentración de 2 µg/ml se procedió a su lectura a diferentes tiempos, en condiciones experimentales análogas. Se calculó el coeficiente de variación, resultando siempre inferior al 5%.

$$CV = 2,003\%$$

- Precisión intermedia. Se analizaron tres soluciones durante tres días consecutivos. Al calcularse el coeficiente de variación se observó que fue inferior al 5%.

$$CV = 1,021\%$$

Exactitud

En el test de homogeneidad de varianzas, mediante la aplicación del test de Cochran, con respecto a los porcentajes de recuperación se obtiene una $C_{exp} = 0,2022$ y una $C_{tab} = 0,6838$, con lo que se puede concluir que hay homogeneidad de varianzas. En el test de validez de medias por el análisis de ANOVA para los porcentajes de recuperación se obtiene una $F_{exp} = 1,13$ y una $F_{tab} = 3,36$, por lo que se puede concluir que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación.

Rango

El intervalo entre los niveles superior e inferior para los que se ha demostrado que el procedimiento es adecuado en lo relativo a su exactitud y linealidad se encuentra entre los valores de concentración de 0,5 a 4 µg/ml.

Robustez

Se determinó introduciendo como variación en el procedimiento, el uso de dos columnas cromatográficas Luna C18 de 150 x 4,6 mm y 3 µ de tamaño de poro interno de distintos lotes (Lote 418417 y Lote 347432) y se comprobó que el método permanecía inalterado. Obteniendo tras la determinación de la concentración de tres soluciones de una concentración de 2 µg/ml un coeficiente de variación menor al 5%.

$$CV = 2,950\%$$

5.3. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) en plasma

Para validar el método analítico se partió de una solución de AmB en DMSO con una concentración de 100 µg/ml. A continuación se tomaron alícuotas de dicha solución y se diluyeron con metanol hasta obtener una serie de soluciones patrón con un intervalo de concentraciones comprendido entre 0,2 y 3 µg/ml. Se tomaron 2 ml de cada una de estas soluciones y se les añadió 1 ml de plasma de conejo. La mezcla se agitó y se centrifugó a 5500 rpm durante 20 minutos con el fin de precipitar las proteínas y se inyectó el sobrenadante en el HPLC con una concentración de AmB en un intervalo de concentraciones comprendido entre 0,13 y 2 µg/ml. De cada concentración se efectuaron tres determinaciones.

Especificidad

El método analítico cumple esta condición como se puede observar en los cromatogramas donde el pico de la AmB es definido y nítido en comparación con un cromatograma que no contiene AmB (Figura 24).

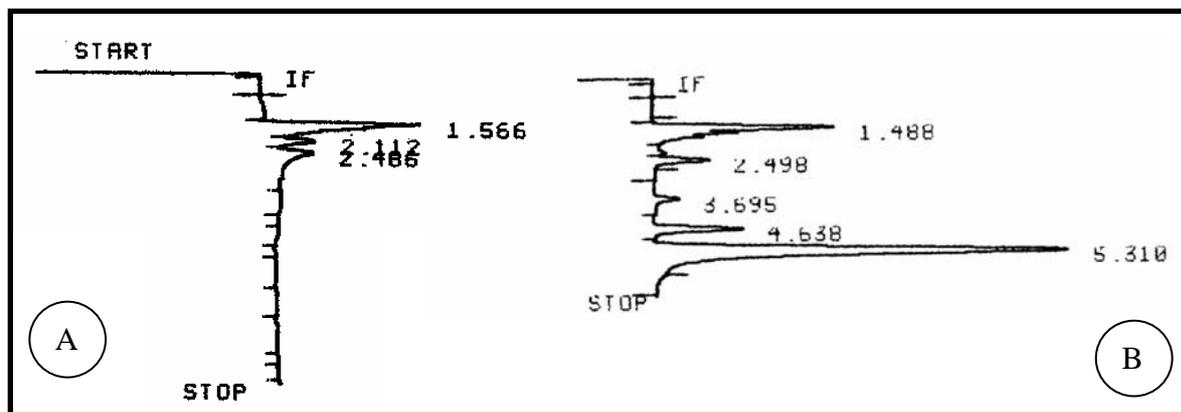


Figura 24. Cromatograma de una microemulsión sin principio activo en plasma (A) y de una microemulsión con principio activo (B) en plasma.

Linealidad

La recta de regresión obtenida por este método se obtuvo por el análisis de regresión por mínimos cuadrados, obteniendo un coeficiente de determinación superior a 0,99, por lo tanto el método es lineal. La ecuación de la recta de regresión es:

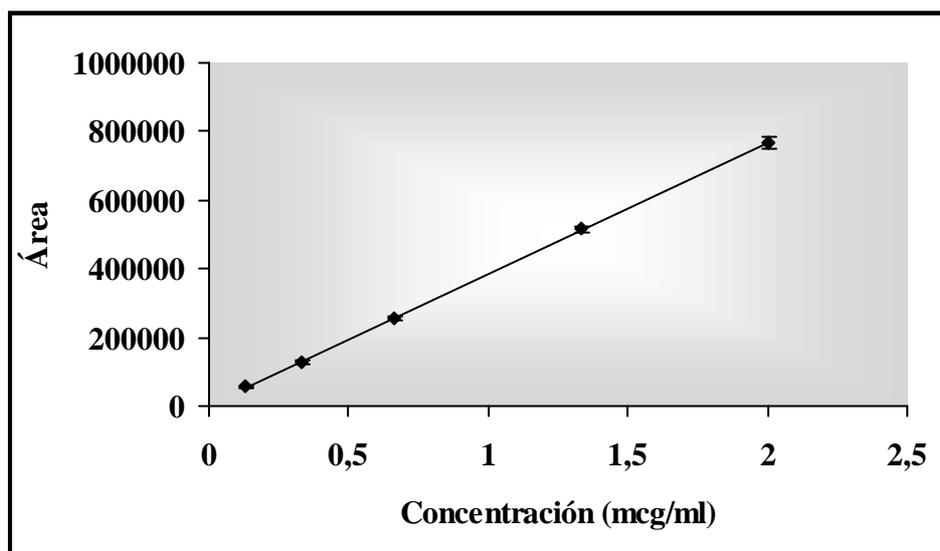


Figura 25. Recta de calibrado del método cromatográfico.

$$\text{Abs} = 382402 * \text{Conc} + 4450$$

$$r^2 = 0,9991$$

Figura 26. Ecuación de la recta de regresión lineal y coeficiente de correlación.

Concentración (µg/ml)	Área
0,13	57885
0,13	57331
0,13	52325
0,33	127398
0,33	123567
0,33	132567
0,66	253331
0,66	259741
0,66	255072
1,33	515643
1,33	526293
1,33	511129
2	764411
2	783902
2	753604

Tabla 22. Valores de área de distintas concentraciones de AmB.

Los valores obtenidos para los parámetros analizados en los ensayos de linealidad se encuentran recogidos en las siguientes Tablas:

Parámetro	Valor	Valor aceptado
Factor de respuesta	393792,04	
Coefficiente de variación	4,745%	< 5%
Varianza del error experimental total	3,492.10 ⁸	

Parámetro	Valor	V.A.	Parámetro	Valor	V.A.
Valor de b	382402,00		Valor de a	4450,33	
Varianza de b	7,421.10 ⁶		Varianza de a	1,018.10 ⁷	
Desviación estándar de b	2729,62		Desviación estándar de a	3197,17	
Desviación estándar relativa de b	0,712%	< 2%	Desviación estándar relativa de a	71,698%	
Límite superior de confianza	388150,00		Límite superior de confianza	11182,88	Incluye el 0
Límite inferior de confianza	376653,99		Límite inferior de confianza	-2282,58	
Test estadístico de b	140,09	> 2,145	Test estadístico de a	1,391	< 2,145

(V. A. = valor aceptado)

Tabla 23. Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal: $y = a + b x$.

A la vista de estos resultados podemos concluir que el método es lineal dentro del rango de concentración utilizado, ya que los valores se encuentran dentro de los límites especificados, y además es un método proporcional, puesto que la recta pasa por el origen de coordenadas.

Precisión

- Repetibilidad. A partir de siete soluciones de trabajo de una concentración de 1,33 µg/ml se procedió a su lectura a diferentes tiempos, en condiciones experimentales análogas. Se calculó el coeficiente de variación, resultando siempre inferior al 5%.

$$CV = 1,519\%$$

- Precisión intermedia. Se analizaron tres soluciones de una concentración de 0,66 µg/ml durante tres días consecutivos. Al calcularse el coeficiente de variación se observó que fue inferior al 5%.

$$CV = 1,317\%$$

Exactitud

En el test de homogeneidad de varianzas, mediante la aplicación del test de Cochran, con respecto a los porcentajes de recuperación se obtiene una $C_{exp} = 0,4224$ y una $C_{tab} = 0,6838$, con lo que se puede concluir que hay homogeneidad de varianzas. En el test de validez de medias por el análisis de ANOVA para los porcentajes de recuperación se obtiene una $F_{exp} = 1,37$ y una $F_{tab} = 3,11$, por lo que se puede concluir que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación.

Límite de detección y cuantificación

El límite de detección observado para este método analítico correspondió a una concentración de 6 ng/ml (Figura 27), y el límite de cuantificación correspondió a una concentración de 66 ng/ml.

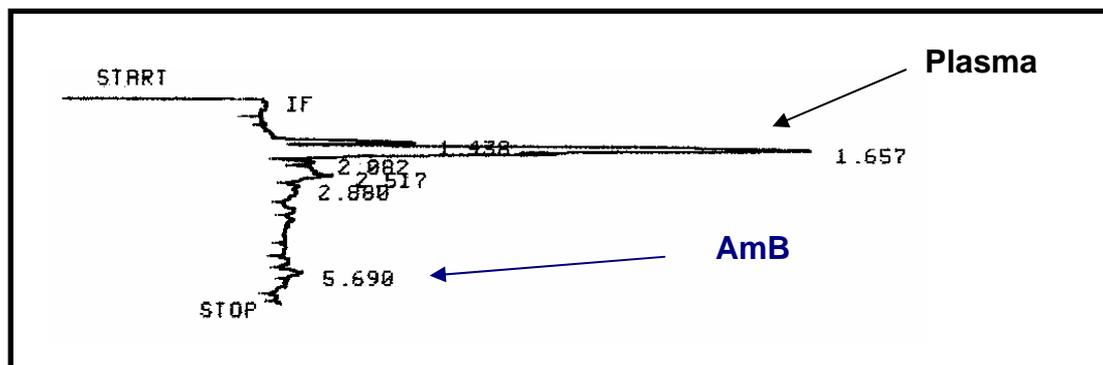


Figura 27. Cromatograma del límite de detección (6 ng/ml) de la AmB en plasma.

Rango

El intervalo entre los niveles superior e inferior para los que se ha demostrado que el procedimiento es adecuado en lo relativo a su exactitud y linealidad se encuentra entre los valores de concentración de 0,13 a 2 µg/ml.

Robustez

Se determinó introduciendo como variación en el procedimiento, el uso de dos columnas cromatográficas Luna C18 de 150 x 4,6 mm y 3 µ de tamaño de poro interno de distintos lotes (Lote 418417 y Lote 387136) y se comprobó que el método permanecía inalterado. Obteniendo tras la determinación de la concentración de tres soluciones de una concentración de 1 µg/ml un coeficiente de variación menor al 5%.

CV= 2,568%

6. LÍMITE DE ANFOTERICINA A.

Este ensayo aparece recogido en la USP 23 para la determinación del contenido en anfotericina A del principio activo materia prima.

La AmB es un antifúngico poliénico sintetizado por el *Streptomyces nodosus*, pero nunca como compuesto puro, sino mezclado con una pequeña proporción de anfotericina A de menor actividad. Debido a ello, la USP obliga mediante este ensayo a determinar en qué proporción se encuentra esta forma del principio activo, estableciendo unos límites en función de la vía de administración del fármaco. Así para la vía parenteral intravenosa, vía de administración de las formulaciones desarrolladas en la presente memoria, la USP 23 (USP 23, 1995) establece un límite de anfotericina A para la materia prima menor o igual al 5%.

Método

Para la determinación del contenido en anfotericina A, se llevan a cabo tres preparaciones correspondientes a:

1. Preparación problema de anfotericina B materia prima.
2. Preparación estándar de anfotericina B USP RS.
3. Preparación estándar de nistatina USP RS.

Las dos primeras preparaciones, se realizan pesando con exactitud una cantidad aproximada de 50 mg de principio activo que se disuelven en 10 ml de DMSO y se transfieren a un matraz aforado de 50 ml, enrasándose a volumen con metanol. Posteriormente, se transfieren 4 ml de esta disolución a un matraz de 50 ml enrasándose a volumen con metanol, obteniéndose de este modo una concentración final de principio activo de 80 µg/ml.

Para obtener la preparación estándar de nistatina, se pesa con exactitud una cantidad aproximada de 20 mg que se disuelven en 40 ml de DMSO y se transfieren a un matraz aforado de 200 ml, enrasándose a volumen con metanol. Posteriormente, se transfieren 4 ml de esta disolución a un matraz de 50 ml enrasándose a volumen con metanol, obteniéndose de este modo una concentración final de principio activo de 8 µg/ml.

A continuación, y de una forma concomitante, se determinan las absorbancias de dichas preparaciones en un espectrofotómetro Beckman DU-6 y en una cubeta de 1 cm de paso óptico, a las longitudes de onda de 304 y 282 nm, utilizando como blanco una disolución DMSO/metanol en proporciones 1:62,5.

Para calcular el % de anfotericina A presente en la materia prima, se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Anfotericina A} = \frac{25 W_N [(A_{B282} \times A_{U304}) - (A_{B304} \times A_{U282})]}{W_U [(A_{B282} \times A_{N304}) - (A_{B304} \times A_{N282})]}$$

Donde:

- W_N = Peso en mg de nistatina USP RS.
- W_U = Peso en mg de anfotericina B materia prima.
- A_{B282} y A_{B304} = Absorbancias de la preparación estándar de anfotericina B USP RS a 282 y 304 nm.
- A_{N282} y A_{N304} = Absorbancias de la preparación estándar de nistatina USP RS a 282 y 304 nm.
- A_{U282} y A_{U304} = Absorbancias de la muestra problema a 282 y 304 nm.

Las determinaciones se hicieron por triplicado obteniéndose el valor medio y la desviación estándar del contenido en anfotericina A de la materia prima, expresado en %.

Resultados

Los resultados obtenidos para determinar el límite de anfotericina A presente en la anfotericina B materia prima se encuentran resumidos en la Tabla 24.

Número de determinaciones	% de Anfotericina A
Determinación 1	5,29
Determinación 2	4,58
Determinación 3	5,12
Valor medio	4,99

Tabla 24. Límites de anfotericina A de la anfotericina B materia prima.

Como se puede comprobar, la AmB materia prima presenta una calidad aceptable para su utilización por vía parenteral intravenosa permitiendo por tanto su formulación en formas farmacéuticas destinadas a su administración por dicha vía.

MICROEMULSIONES DE ANFOTERICINA B

Este estudio se realizó con el fin de mejorar tecnológicamente las microemulsiones desarrolladas en el Departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica de la UCM, respecto al tamaño de gotícula, estabilidad, propiedades reológicas y demás propiedades farmacotécnicas. Para ello se sustituyó el tensioactivo de las microemulsiones ya desarrolladas (Tween[®] 80) por el tensioactivo Brij[®] 96V y también se modificó ligeramente el método de obtención de las mismas.

Desde el punto de vista farmacéutico, las microemulsiones presentan numerosas ventajas frente al resto de sistemas coloidales (emulsiones convencionales), y son una alternativa como sistemas transportadores de fármacos. Estos agregados estables son capaces de disolver cantidades considerables de sustancias liposolubles, hidrosolubles y anfifílicas ya que presentan amplios dominios acuosos, oleosos e interfaciales. Las microemulsiones son sistemas de fácil preparación, ya que se forman espontáneamente y sus microestructuras se forman independientemente del orden de adición de los distintos componentes. Su transparencia óptica y baja viscosidad aseguran una buena apariencia de la forma farmacéutica y facilitan su manejo y dosificación; su gran estabilidad hace de ellas sistemas poco perecederos, con una larga vida media.

1. COMPONENTES DE LA MICROEMULSIÓN

Los materiales empleados para la preparación de microemulsiones fueron:

- 1.1 **Miristato de isopropilo** (Suministrado por Merck Chemicals, Madrid, España). También denominado IPM o 1-metiletil tetradecanoato, es un líquido oleoso, de baja viscosidad, incoloro y prácticamente inodoro, constituyente mayoritario de la fase interna de la microemulsión, compuesto por ésteres de 2-propanol y ácidos grasos saturados de elevado peso molecular, principalmente ácido mirístico. Presenta un peso molecular de 270,51, su fórmula empírica corresponde a C₁₇H₃₄O₂ y su fórmula estructural aparece reflejada en la Figura 28.

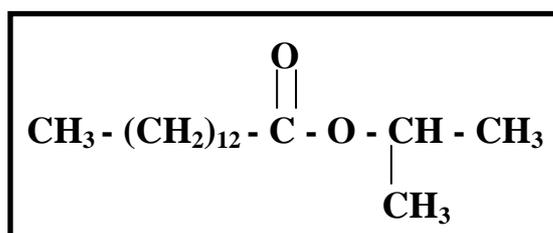


Figura 28. Fórmula estructural del IPM.

Desde el punto de vista de sus propiedades fisicoquímicas, el IPM es un compuesto soluble en acetona, cloroformo, etanol, acetato de etilo, grasas, alcoholes grasos, aceites de síntesis, hidrocarburos líquidos, tolueno y ceras, siendo prácticamente insoluble en glicerina, propilenglicol y agua. El IPM presenta numerosas aplicaciones dentro del campo de la tecnología farmacéutica como emoliente, vehículo oleoso, promotor de la absorción a través de la piel y solvente de numerosas sustancias de aplicación tópica, apareciendo por ello en numerosos preparados farmacéuticos tópicos y en formulaciones cosméticas. Debido a su gran estabilidad y

resistencia frente a la oxidación, hidrólisis y fenómenos de enranciamiento, así como su prácticamente nula toxicidad subcutánea e irritabilidad (Pope, D. G. 1994), es un candidato idóneo para ser utilizado en formas farmacéuticas parenterales (Kibbe, A. H. 2000).

- 1.2 **Brij® 96V** (Suministrado por Sigma Chemical Co., Madrid, España). También denominado deca-etoxi-oleil éter o polietilenglicol monoleil éter, es un líquido viscoso, de color cremoso, que a temperaturas superiores a 40°C, toma un color amarillento claro y translúcido. Presenta una fórmula estructural que aparece reflejada en la Figura 29.

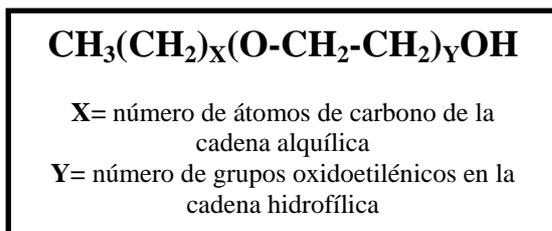


Figura 29. Fórmula estructural del Brij® 96V.

Es un tensioactivo no iónico producido por la polietoxilación de ácidos grasos hidroxilados lineares. Estos productos suelen ser mezclas de polímeros de pesos moleculares variados.

Se usa en la preparación de microemulsiones y emulsiones tanto O/A como A/O, por sus propiedades solubilizantes tanto de aceites esenciales como de vitaminas y otros fármacos de baja solubilidad en agua. Es estable en medios altamente básicos o ácidos y se considera un agente no tóxico ni irritante. Aparece descrito tanto en el Formulario Nacional USP como en la Farmacopea Japonesa (Kibbe, A. H. 2000).

- 1.3 **Lecitina** (Suministrado por Sigma Chemical Co., Madrid, España). Las lecitinas son sustancias constituidas por una mezcla de compuestos, entre los que destacan en función del origen y del grado de purificación de la lecitina, la fosfatidilcolina como componente mayoritario, (Figura 30), la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol, todos combinados con triglicéridos, ácidos grasos y carbohidratos, obtenidos de un aceite vegetal como por ejemplo el de soja.

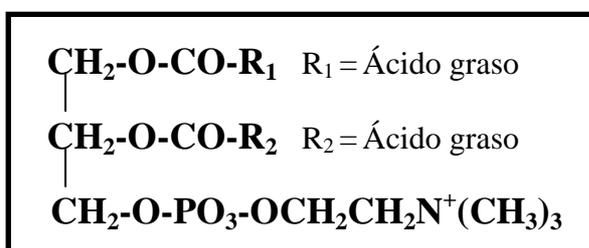


Figura 30. Fórmula estructural de la α-fosfatidilcolina.

Desde el punto de vista de su apariencia física, las lecitinas presentan aspectos muy variados, desde semilíquidos viscosos hasta sólidos pulverulentos, en función de su contenido en ácidos grasos libres. Asimismo pueden variar en el color (de marrón a amarillo claro) y en el olor dependiendo de que su origen sea animal o vegetal.

Las lecitinas son solubles en hidrocarburos alifáticos, aromáticos y halogenados, así como en aceites minerales y ácidos grasos, formando emulsiones cuando se dispersan en agua y son prácticamente insolubles en agua, y en solventes polares.

Desde el punto de vista de su estabilidad, las lecitinas se descomponen frente a valores extremos de pH y a temperaturas superiores a 160°C cuando son expuestas durante 24 horas. Asimismo, son higroscópicas, pudiendo sufrir fenómenos de hidrólisis y descomposiciones de naturaleza microbiana. Deben almacenarse en recipientes opacos para evitar la fotooxidación y a bajas temperaturas alrededor de los 4°C.

Finalmente, las lecitinas son sustancias que presentan una amplia variedad de aplicaciones farmacéuticas así como en las industrias cosmética y alimentaria. Dentro del campo de la tecnología farmacéutica, las lecitinas son muy utilizadas como agentes dispersantes, emulsificantes y estabilizantes y se incluyen en formulaciones destinadas a la administración parenteral, como por ejemplo en la nutrición parenteral, debido a la nula toxicidad que presentan, ya que son componentes naturales de las membranas celulares.

La lecitina empleada en las formulaciones de tipo microemulsión desarrolladas en la presente memoria fue de origen vegetal (soja), con un contenido en fosfatidilcolina del 21%, en fosfatidiletanolamina del 22%, y en fosfatidilinositol del 19% y se empleó como agente tensioactivo de la formulación (Kibbe, A. H. 2000).

- 1.4 Manitol** (Suministrado por Merck Chemicals, Madrid, España). El D-manitol es un alcohol hexacarbonado, relacionado con la manosa y con su isómero el sorbitol.

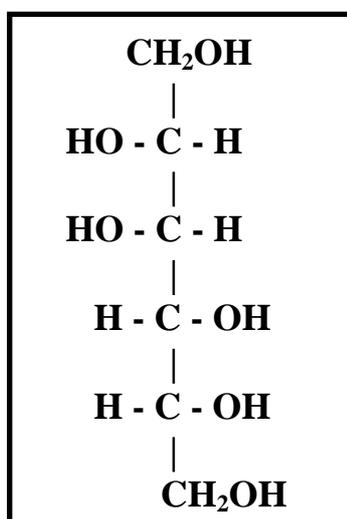


Figura 31. Fórmula estructural del manitol.

Es un polvo blanco, cristalino e inodoro con un sabor dulce que presenta una estructura en forma de agujas ortorrómbicas tras su cristalización con alcohol. Se obtiene por extracción alcohólica en caliente a partir de numerosos productos naturales, ya que está presente en pequeñas cantidades en prácticamente todos los vegetales y se produce comercialmente mediante reducción catalítica o electrolítica de monosacáridos tales como la glucosa y la manosa. Presenta un peso molecular de

182,17, su fórmula empírica corresponde a $C_6H_{14}O_6$, y su fórmula estructural aparece reflejada en la Figura 31.

Desde el punto de vista de su propiedades físicoquímicas, el manitol tiene un punto de fusión entre 166-168°C y es soluble en soluciones alcalinas, en etanol, en glicerina, en agua, y prácticamente insoluble en éter.

El manitol es un agente no higroscópico, estable tanto en estado seco como en soluciones acuosas ácidas o básicas y no se oxida en presencia del oxígeno atmosférico, en ausencia de catalizadores.

El manitol se usa ampliamente en productos alimentarios como edulcorante, y en la formulación de preparados farmacéuticos como agente diluyente en la preparación de comprimidos, como plastificante en cápsulas de gelatina, como diurético osmótico en una solución sobresaturada al 20-25% (p/v) y como agente de carga en preparados liofilizados, esta última aplicación es la que se va a emplear en la formulación de microemulsiones de anfotericina B en una proporción del 5% (p/p) (Kibbe, A. H. 2000).

2. PREPARACIÓN DE LAS MICROEMULSIONES

Para la preparación de las microemulsiones, se pesaron cantidades determinadas de agua y de lecitina y se mezclaron conjuntamente. Por otra parte se mezcló la fase oleosa constituida por miristato de isopropilo (IPM), y el tensioactivo Brij® 96V. Ambas fases se mezclaron en un vaso de precipitados con una agitación de 16000 r.p.m. en un agitador Ultra Turrax® T25 Basic (IKA Labortechnik), durante 2 minutos. Al finalizar dicho tiempo la microemulsión se consideraba formada cuando se obtenía un fluido transparente, claro, homogéneo, ópticamente isotrópico y estable.

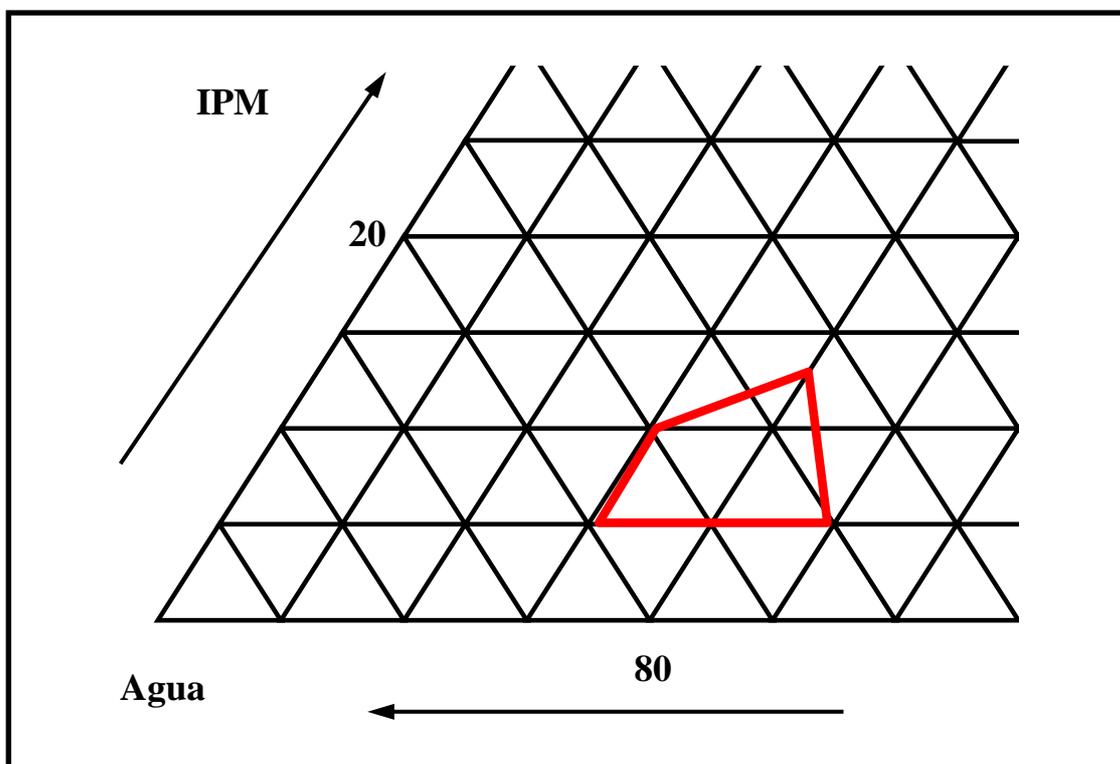


Figura 32. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones en una proporción Brij® 96V/lecitina de 1:1 (p/p).

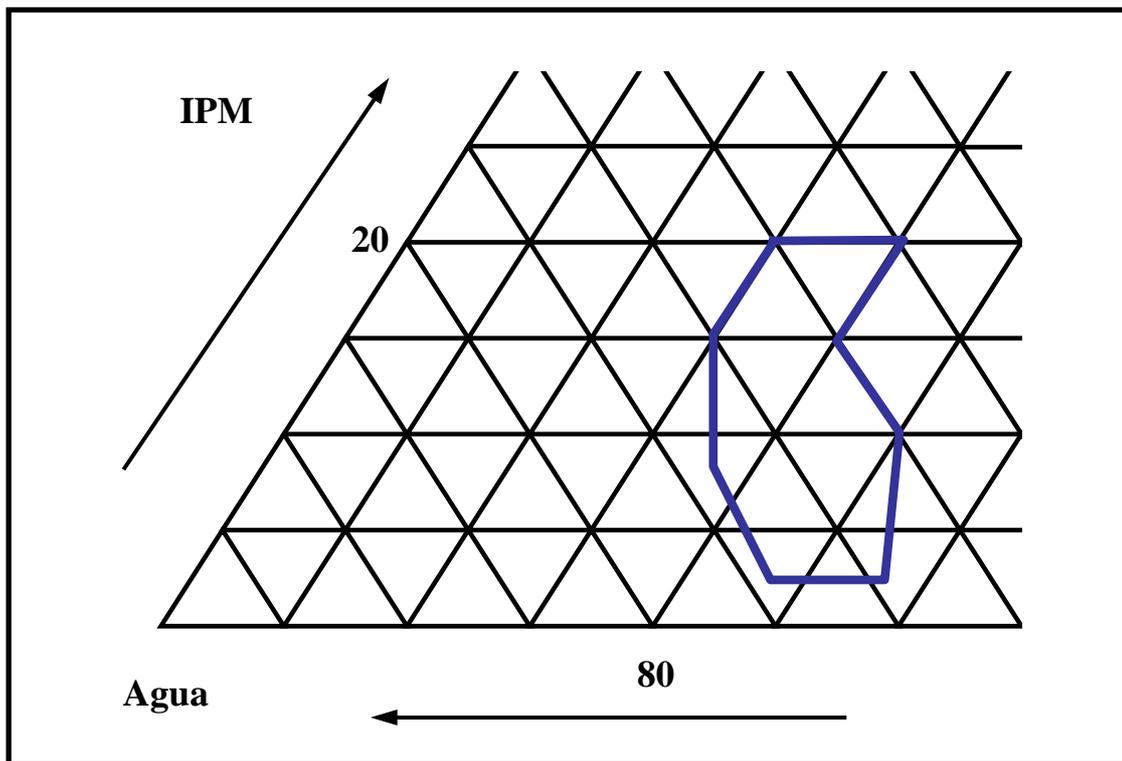


Figura 33. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones en una proporción Brij[®] 96V/lecitina de 1,5:1 (p/p).

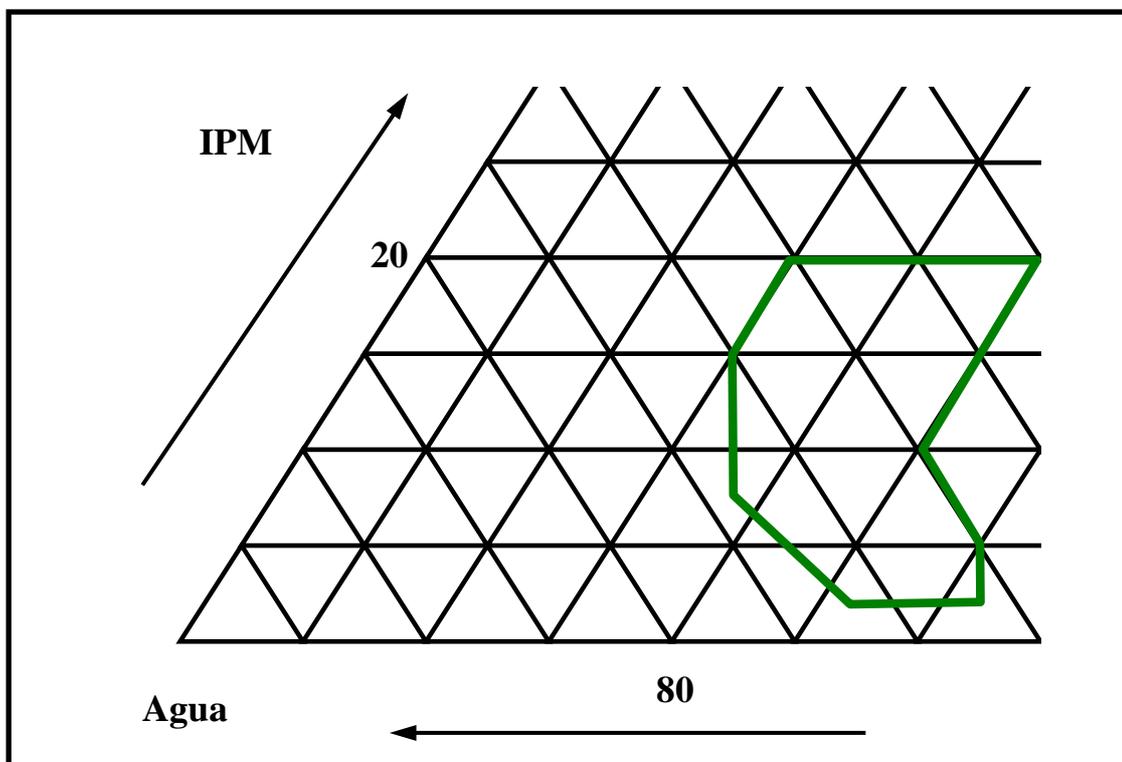


Figura 34. Diagrama de fases pseudo-ternario y área de formación de microemulsiones en una proporción Brij[®] 96V/lecitina de 2:1 (p/p).

Se determinó el área de existencia de la microemulsión O/A de los cuatro componentes ya indicados en la que permanecía estable a temperatura ambiente durante al menos una semana, mediante la obtención de un gran número de muestras. Se realizaron varios diagramas de fases en los que se modificaba la proporción de tensioactivo (Brij® 96V)/cotensioactivo (lecitina) en 1:1, 1,5:1 y 2:1 (p/p), y se vio como se modificaba el área de existencia de la microemulsión. En todos los diagramas de fases la proporción del tensioactivo se mantuvo por debajo del 20% para evitar problemas de toxicidad.

Como se ve en la Figura 32, el menor área de existencia de microemulsión corresponde al diagrama de fases en el que la proporción de Brij® 96V:lecitina es de 1:1 (p/p), además estas microemulsiones presentaban unas propiedades físicas y de estabilidad peores que a otras proporciones.

Como se puede observar en los diagramas de fases obtenidos, a medida que se aumenta la cantidad del tensioactivo Brij® 96V en la formulación, se incrementa el área de existencia de microemulsión. La razón de este comportamiento puede ser debido a las propiedades altamente lipofílicas de la lecitina, que impiden la formación espontánea de la microemulsión sin la presencia de cantidades elevadas de tensioactivo. El tensioactivo incrementa el carácter hidrofílico de la lecitina y como consecuencia favorece la curvatura de la película interfacial entre las dos fases y la formación de la microemulsión.

De todas las microemulsiones formadas se seleccionaron aquellas con menores proporciones de Brij® 96V:lecitina, debido a la toxicidad del polioxietilen éter. Además se seleccionaron aquellas microemulsiones de mayor transparencia y mejores propiedades reológicas. Es preciso destacar que se seleccionaron también aquellas microemulsiones en las cuales la cantidad de lecitina fuera de aproximadamente un 10%, debido a la importancia de la lecitina en la incorporación de la anfotericina B, ya que la anfotericina B es un compuesto anfifílico y sus moléculas se encuentran intercaladas en la monocapa fosfolipídica de la lecitina en la superficie de la gotícula de aceite, formando entre ambas moléculas un complejo fuertemente unido (Moreno, M. et al. 2001, Lance, M. R. et al. 1996, Tabosa do Egito, E. S., et al. 1994)). Las microemulsiones seleccionadas aparecen indicadas en la Tabla 25.

Microemulsión	Lecitina	Brij® 96V	Agua	IPM	AmB (mg/ml)
A ^{II}	10	15	70	5	20
A1 ^I	10	15	70	5	20
A2 ^I	10	15	70	5	30
A3 ^I	10	15	70	5	40
B ^{II}	10	15	65	10	20
D ^{II}	10	20	67,5	2.5	20
E ^{II}	10	10	72,5	7.5	20

^I Incorporación de la AmB por el método I de inversión de fases

^{II} Incorporación de la AmB por el método II mediante la mezcla de la AmB con la fase acuosa de la microemulsión

Tabla 25. Composición (en % p/p) de las microemulsiones de anfotericina B.

3. INCORPORACIÓN DE LA AmB A LAS MICROEMULSIONES

Para incorporar la AmB a las microemulsiones se emplearon dos métodos diversos.

- **Método I:** Se tomaron 10 ml de la microemulsión A, se calentó hasta alcanzar el punto de inversión de fases (PIT) de los tensioactivos a 65°C y se le añadieron 2ml de una solución acuosa de hidróxido sódico 0,1 M con diferentes cantidades de AmB (20, 30 y 40 mg), obteniendo las microemulsiones A1, A2 y A3 respectivamente. Las microemulsiones se agitaron fuertemente en un vórtex, hasta obtener sistemas transparentes y el pH final de cada microemulsión se ajustó a 8,5-9,5 con ácido ortofosfórico 1N, ya que a este pH la AmB se incorpora totalmente a la microemulsión y se considera un pH fisiológicamente aceptable (Moreno, M. A. et al. 2001).
- **Método II:** Para aquellas microemulsiones en las que la AmB no se incorporaba correctamente mediante el método del PIT, se empleó un procedimiento diferente. Se pesaron 20 mg de AmB que se disolvieron en 2 ml de una solución acuosa de hidróxido sódico 0,1 M y se mezcló con la fase acuosa de la microemulsión y la lecitina (microemulsiones A, B, D y E). Una vez mezclado homogéneamente se le añadió la fase oleosa y se agitó a 16000 r.p.m. durante 2 minutos.

Una vez formada la microemulsión se ajustó el pH de las microemulsiones con ácido ortofosfórico 1N hasta un pH comprendido entre 8,5 y 9,5.

La cuantificación del principio activo presente en las distintas muestras se realizó por HPLC y Espectrofotometría, según el método descrito por Moreno, M. A. y sus colaboradores (Moreno, M. A. et al. 1998). Se tomaron 10 ml de la microemulsión con anfotericina B y se introdujeron en un matraz de 50 ml y se añadió DMSO (dimetilsulfóxido) hasta completar el volumen. El matraz se sometió a ultrasonidos durante 10 minutos, y su contenido se transfirió a un tubo de centrifugación de 50 ml. Se centrifugó a 9000 r.p.m. durante 45 min y se eliminó el sobrenadante. La solución resultante se diluyó en metanol hasta alcanzar la concentración de 2 µg/ml. El número de muestras estudiadas para cada tipo de microemulsión fue de tres, y los análisis de cada muestra se realizaron por triplicado.

El porcentaje de fármaco incorporado a la microemulsión fue de $98 \pm 1,5\%$, obteniéndose una pequeña diferencia entre el fármaco añadido y el recuperado que puede ser debido al complejo fuertemente ligado que forman la lecitina y la AmB, lo que conlleva la dificultad de separación de pequeñas cantidades de fármaco, siguiendo el método de extracción descrito, y la consiguiente pérdida con el sobrenadante.

4. ESTUDIOS REOLÓGICOS Y DE VISCOSIDAD

Los estudios reológicos y de viscosidad son determinaciones necesarias para caracterizar físicamente las microemulsiones y controlar su estabilidad (Constantinides, P. P. et al. 1995, Ktistis, G. et al. 1990).

La viscosidad y el comportamiento reológico de las microemulsiones se determinó por triplicado usando un viscosímetro de disco rotatorio Brookfield, modelo HB, dotado de un sistema de procesamiento de datos Rheocalc V 1.1. Las medidas se efectuaron a una temperatura de 25 ± 1 °C, y el disco empleado fue el CP-41, adecuado para líquidos con viscosidades menores de 975 cPs.

El comportamiento reológico de las microemulsiones fue estudiado en ciclos de "subida y bajada" con velocidades de giro del disco comprendidas entre 0 y 25 r.p.m. En el caso de que los perfiles correspondieran a fluidos newtonianos ($r^2 \geq 0,99$), el valor de la viscosidad se determinó a partir de la pendiente de la recta obtenida al representar gráficamente la fuerza de cizalla frente al intervalo de cizalla; sin embargo, en el caso de que se tratasen de fluidos no newtonianos, el valor de viscosidad se obtuvo a partir del valor calculado por el viscosímetro a la máxima velocidad de giro del disco (25 r.p.m.).

Los estudios reológicos que aparecen en la Figura 35, muestran que las microemulsiones A y B presentan un comportamiento newtoniano con coeficientes de determinación de 0,9956 y 0,9996 respectivamente, lo que prueba la relación lineal entre la fuerza de cizalla y el intervalo de cizalla para dichos sistemas. Así mismo se puede observar que la viscosidad de la microemulsión B fue cuatro veces mayor que la de la microemulsión A, siendo el porcentaje de agua, el único parámetro de la formulación que varía para ambas microemulsiones, (65% para la microemulsión B y 70% para la microemulsión A). La viscosidad de las microemulsiones A1, A2 y A3 fue análoga a la de la microemulsión A.

Las microemulsiones D y E presentaron coeficientes de determinación inferiores a 0,99 por lo que no fueron consideradas fluidos newtonianos, y sus viscosidades se obtuvieron a partir del valor calculado por el viscosímetro a la máxima velocidad de giro del disco (25 r.p.m.).

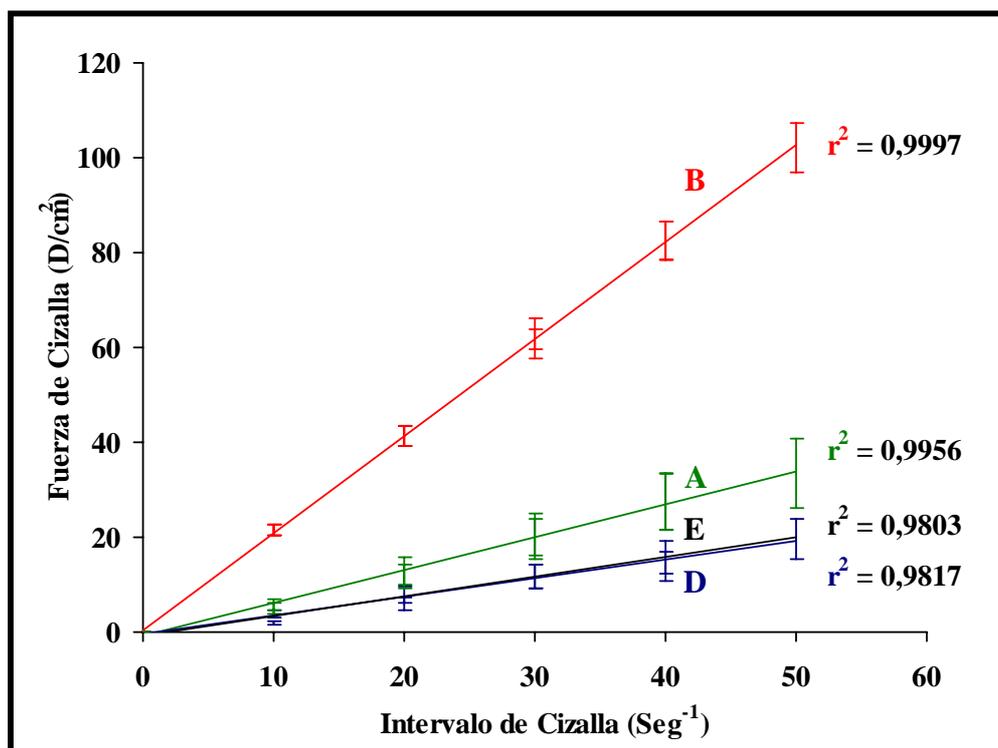


Figura 35. Comportamiento reológico de distintas microemulsiones de AmB: **A** 1:1,5 lecitina/Brij[®] 96V, 70% de agua, **B** 1:1,5 lecitina/Brij[®] 96V, 65% de agua, **E** 1:1 lecitina/Brij[®] 96V, 72,5% de agua y **D** 1:2 lecitina/Brij[®] 96V, 67,5% de agua.

Se realizaron una serie de estudios en los que se observó la posible variación de la viscosidad de las microemulsiones con y sin principio activo, y se pudo concluir que la presencia de AmB en las microemulsiones no alteraba los valores de viscosidad de las mismas.

En la Figura 36, aparecen reflejados los valores de viscosidad para las formulaciones estudiadas.

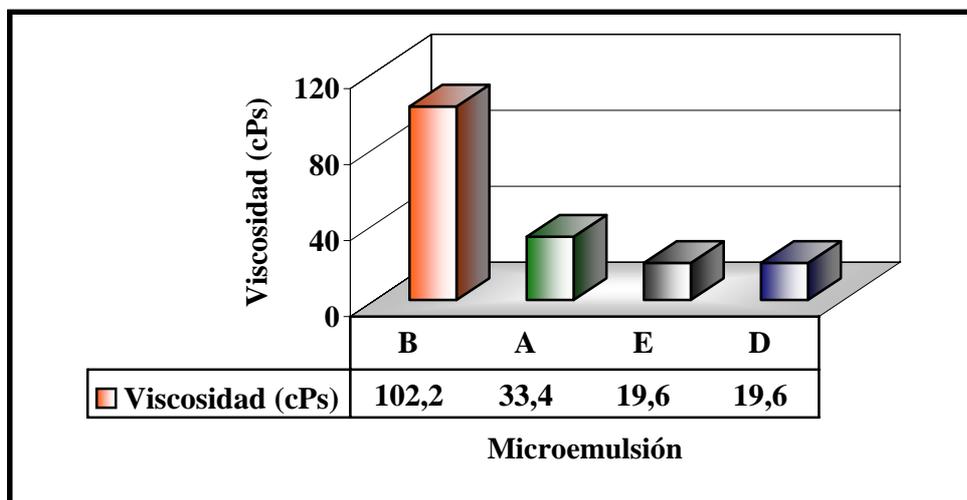


Figura 36. Medida de viscosidad de las microemulsiones A, B, E y D.

En la Figura 37, se recogen los valores de viscosidad de las microemulsiones en función del porcentaje de agua que poseen. Excepto para la microemulsión D, formulada con un 67,5% de agua, para el resto de las microemulsiones, a medida que incrementamos la cantidad de agua disminuye la viscosidad, por lo que el comportamiento anómalo de la microemulsión D puede ser debido a la mayor presencia de tensioactivo en la formulación.

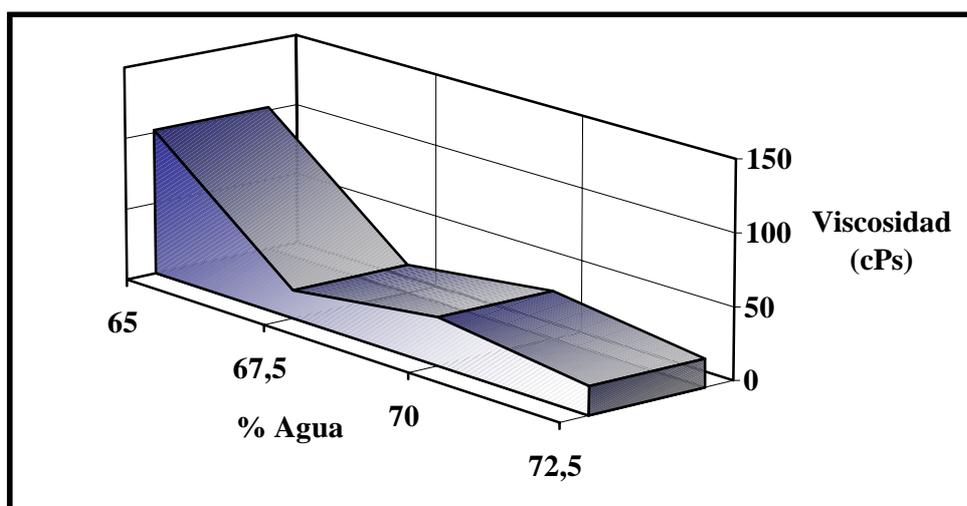


Figura 37. Medida de viscosidad en función del porcentaje de agua de las microemulsiones A, B, E y D.

5. ESTUDIOS DE DILUCIÓN DE LAS MICROEMULSIONES

Se realizaron estos estudios con el fin de determinar la integridad física de los sistemas frente a un exceso de fase acuosa, ya que estas microemulsiones fueron diseñadas para ser administradas por infusión intravenosa en una dilución con suero glucosado al 5%.

Para realizar el estudio se procedió a diluir en una proporción 1:5, v/v las microemulsiones A y B en una solución de suero glucosado isotónico al 5%, observándose los posibles cambios físicos en el sistema a lo largo del tiempo (72 horas). Tanto las microemulsiones A y B y las microemulsiones A1, A2 y A3 con diferentes cantidades de AmB (20, 30 y 40 mg respectivamente) resultaron ser estables frente a la dilución,

La microemulsión E, cuya composición presenta un porcentaje menor del tensioactivo Brij® 96V (10%) y la microemulsión D, con un porcentaje muy reducido de IPM (2,5%), presentaban peores características físicas que las demás, al ser menos transparentes que las otras formulaciones y no poder ser consideradas fluidos newtonianos. Además de enturbiarse se observó una precipitación del principio activo a las 24 horas de ser diluidas y tampoco fueron estables a temperatura ambiente, sin someterse a dilución, durante una semana, por lo tanto tuvieron que ser rechazadas para posteriores estudios y se desestimaron como sistemas para la administración intravenosa del principio activo.

6. ESTUDIOS DEL TAMAÑO DE GOTÍCULA DE LA FASE INTERNA

La determinación del tamaño medio y la distribución del tamaño de gotícula de las microemulsiones se realizó por PCS (Photon Correlation Spectroscopy) también denominado Espectroscopía de Correlación Fotónica, utilizándose para ello un fotocorrelador Malvern Zetamaster-S con un ángulo fijo de 90°. El análisis de las muestras se realizó a 25°C, el número de determinaciones por cada muestra fue de 10 y el análisis de los datos se llevó a cabo automáticamente con el programa Contin.

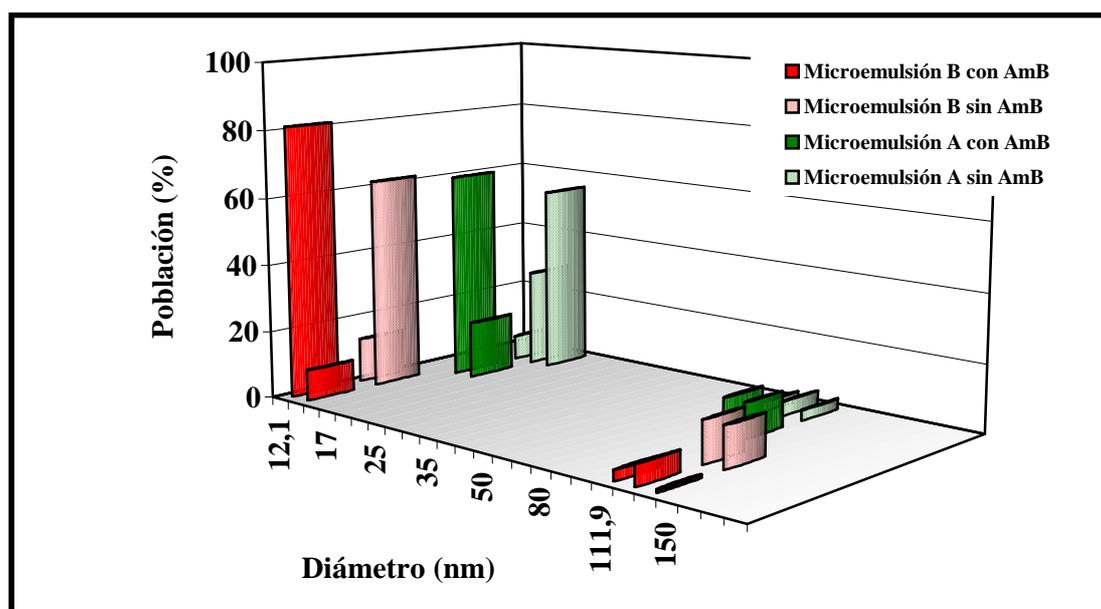


Figura 38. Distribución de los tamaños de gotícula de las microemulsiones A y B con y sin AmB. (La AmB se incorporó por el método de temperatura de inversión de fases en una concentración de 2 mg/ml).

Previo a su medida, todas las muestras fueron diluidas (1:5 v/v) con fase externa (agua destilada ultrapura) y filtradas a través de filtros de membrana Sartorius de 0,45 μm de tamaño de poro, para eliminar partículas ajenas al sistema. Se vio que la cantidad de AmB incorporada a la microemulsión A (20, 30 o 40 mg por cada 10 ml de microemulsión) no alteraba significativamente el tamaño de gotícula de la fase interna, ni tampoco variaba el tamaño de gotícula al variar de método de incorporación de la AmB a la microemulsión.

El tamaño medio de las microemulsiones A y B fue de 52,5 y 46,2 nm con una polidispersión de 0,574 y 0,608 respectivamente y la incorporación de AmB a la microemulsión no afectó al tamaño medio ni a la distribución del tamaño de gotícula de las microemulsiones. La distribución del tamaño de gotícula de las microemulsiones presentó dos modas diferentes de poblaciones de partículas. El $80\% \pm 5\%$ de las gotículas de la microemulsión presentaban un diámetro medio de 15 ± 10 nm, y un grupo muy reducido de gotículas, que representaban menos del 15% del total de las gotículas, presentaban un diámetro medio de 120 ± 25 nm (Figura 38).

7. DETERMINACIÓN DEL pH DE LAS MICROEMULSIONES

El pH de las microemulsiones debe estar comprendido entre 8,5 y 9,5 para asegurar la estabilidad del fármaco en el seno de la formulación y su correcta administración por vía intravenosa sin causar irritación ni otros daños. Para su determinación se empleó un pHmetro Crison micropH 2002, y el número de determinaciones para cada muestra fue de 3.

8. ESTABILIDAD DE LAS MICROEMULSIONES

Para comprobar la estabilidad de las microemulsiones se realizaron una serie de estudios de estabilidad:

8.1 Test de centrifugación. Una de las condiciones que deben cumplir las microemulsiones además de su transparencia es la posibilidad de someterse a una elevada velocidad de agitación sin que se produzca la separación de las fases. Para realizar este estudio las microemulsiones fueron centrifugadas en una centrífuga Universal 32 Hettich Zentrifugen a 9000 r.p.m. durante 20 minutos. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Tabla 26, en la que se puede observar que en ninguna microemulsión se produjo una alteración en la viscosidad, pH o tamaño medio de gotícula de las mismas.

8.2 Ciclos de congelación-descongelación. Este estudio es importante para comprobar si las microemulsiones son capaces de soportar choques térmicos y también para determinar la estabilidad tanto física como química del sistema disperso. Se estudió la integridad de las microemulsiones tras someterse sucesivamente a tres ciclos de 48 horas en los que se varió la temperatura. Cada ciclo consistía en un periodo de 24 horas a 25°C seguido de un periodo de 24 horas a -5°C . Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Tabla 26, en la que se puede observar que en ninguna microemulsión se produjo una alteración significativamente importante en la viscosidad, pH o tamaño medio de gotícula de las mismas.

	Tiempo 0			Test de centrifugación			Ciclos de congelación-descongelación		
	pH	Tamaño (nm) (IP)	Viscosidad (cPs)	pH	Tamaño (nm) (IP)	Viscosidad (cPs)	pH	Tamaño (nm) (IP)	Viscosidad (cPs)
A	9,3 ± 0,06	46,9 (0,585)	27,5 ± 7,90	8,6 ± 0,06	43,3 (0,595)	25,8 ± 6,20	9,0 ± 0,09	47,5 (0,565)	24,3 ± 7,90
A1	8,8 ± 0,04	52,5 (0,520)	23,6 ± 3,10	9,3 ± 0,06	47,5 (0,540)	23,4 ± 2,66	9,3 ± 0,05	51,4 (0,530)	25,7 ± 2,01
A2	8,8 ± 0,12	61,3 (0,620)	23,5 ± 2,59	8,5 ± 0,06	55,1 (0,550)	26,1 ± 4,75	8,5 ± 0,11	58,1 (0,610)	26,1 ± 2,11
A3	8,9 ± 0,09	58,4 (0,481)	27,5 ± 5,47	8,9 ± 0,02	46,4 (0,511)	27,3 ± 4,02	8,5 ± 0,06	46,9 (0,502)	28,2 ± 3,68
B	8,8 ± 0,02	43,9 (0,539)	102,6 ± 4,39	8,5 ± 0,02	42,5 (0,536)	101,7 ± 3,89	8,7 ± 0,07	47,8 (0,541)	122,1 ± 2,70

IP = Índice de polidispersidad

Tabla 26. Tamaño medio, viscosidad y pH de las microemulsiones A y B tras someterse a estudios de estabilidad.

8.3 Estudios de estabilidad física y química. Se realizaron estudios de estabilidad de las microemulsiones durante 21 días a una temperatura de 25°C. A los tiempos 0, 7, y 14 días se tomaron muestras para analizar el pH, el tamaño medio de gotícula, la viscosidad y el contenido en principio activo (Tabla 27).

	Tiempo 0				Tiempo 7 días			
	pH	Tamaño (nm) (IP)	Viscosidad (cPs)	Contenido en AmB (%)	pH	Tamaño (nm) (IP)	Viscosidad (cPs)	Contenido en AmB (%)
A	8,5 ± 0,12	36,4 (0,602)	31,9 ± 3,10	101,4 ± 2,5	8,6 ± 0,04	41,8 (0,493)	29,9 ± 3,02	96,4 ± 23,1
A1	8,9 ± 0,08	47,3 (0,515)	27,8 ± 2,11	99,1 ± 1,3	9,0 ± 0,09	56,9 (0,587)	34,1 ± 4,55	98,1 ± 2,0
A2	8,9 ± 0,06	55,6 (0,580)	33,8 ± 4,17	97,3 ± 0,9	8,7 ± 0,13	52,9 (0,612)	36,7 ± 3,20	98,1 ± 1,5
A3	8,8 ± 0,09	42,9 (0,619)	25,1 ± 2,86	102,4 ± 3,1	8,7 ± 0,14	39,1 (0,487)	28,6 ± 1,85	99,2 ± 2,7
B	8,7 ± 0,10	51,8 (0,498)	112,8 ± 5,48	96,1 ± 2,7	8,8 ± 0,05	38,5 (0,603)	126,4 ± 4,20	102,1 ± 1,9

IP = Índice de polidispersidad

Tabla 27. Tamaño medio, viscosidad, contenido en AmB y pH de las microemulsiones A y B tras someterse a estudios de estabilidad durante 1 semana.

Los resultados obtenidos mostraron que las microemulsiones comenzaban a sufrir fenómenos de degradación al séptimo día de almacenamiento y que por lo tanto estos sistemas dispersos sufrían una inestabilidad física y química, debido principalmente a la presencia de lecitina en la formulación y a su posible hidrólisis por la acción del medio acuoso sobre los fosfátidos presentes en su composición. Por lo tanto basándonos en el método descrito por Moreno, M. A. y sus colaboradores, se liofilizaron las microemulsiones de AmB para conseguir una mayor estabilidad tanto física como química del sistema (Moreno, M. A. et al. 2001).

9. LIOFILIZACIÓN DE LAS MICROEMULSIONES

De todas las formulaciones estudiadas, se escogieron las 2 formulaciones que presentaron mejores características externas tras ser sometidas a los ciclos de cambio de temperatura y al test de centrifugación, para llevar a cabo estudios de estabilidad a largo plazo mediante su liofilización. Estas dos formulaciones fueron las microemulsiones A y B, ambas formulaciones con una concentración del principio activo de 2 mg/ml de microemulsión y en el caso de la microemulsión A la AmB se incorporó por el método de inversión de fases por elevación de la temperatura, mientras que para la microemulsión B la AmB se incorporó junto con la fase acuosa y la lecitina.

Para llevar a cabo la liofilización de las microemulsiones fue necesaria la introducción de un agente de carga a la formulación dadas las características fisicoquímicas de la mayoría de sus componentes. Así se adicionó a la fase acuosa manitol en una proporción del 5%, p/v. Una vez obtenidas las microemulsiones de AmB se dosificaron en viales de 30 ml con un contenido en microemulsión de 10 ml por cada vial que fueron inmediatamente introducidos dentro de la cámara del liofilizador y protegidos de la luz. Seguidamente se llevó a cabo el proceso de liofilización de todas las muestras preparadas en un liofilizador Telstar con las siguientes condiciones de trabajo:

- *Etapa de congelación* con una duración de 2 horas y una temperatura del producto final de aproximadamente -40°C , con una presión de cámara atmosférica y una temperatura del condensador de 19°C .
- *Etapa de desecación primaria* con una duración de 24 horas y una temperatura del producto de aproximadamente -36°C , con una presión de cámara de 30 micrones y una temperatura del condensador de -50°C .
- *Etapa de desecación secundaria* con una duración de 40 horas y una temperatura del producto final de aproximadamente 30°C , con una presión en cámara de 30 micrones y una temperatura del condensador de -50°C .

9.1. Caracterización de las microemulsiones liofilizadas

Los estudios de caracterización de las microemulsiones liofilizadas se realizaron sobre tres muestras tomadas al azar de la bandeja del liofilizador para cada microemulsión, y los estudios realizados fueron los siguientes:

9.1.1 Aspecto, color y olor de las microemulsiones liofilizadas

Las microemulsiones liofilizadas presentaron un aspecto homogéneo, consistente, pastoso, de escasa fluidez, de color amarillo cremoso y prácticamente inodoras.

9.1.2 Contenido en humedad de las microemulsiones liofilizadas

Para la determinación del contenido en humedad de las muestras se empleó la técnica de Karl-Fisher, con un procesador Metrohm 658 Processor y 665 Dossimat. El número de determinaciones por muestra fue de 3. Los resultados obtenidos indicaron que el producto liofilizado posee una humedad de $0,86 \pm 0,06\%$ para la microemulsión A y $0,79 \pm 0,04\%$ para la microemulsión B.

Este bajo porcentaje de humedad permite conservar en óptimas condiciones a la lecitina y al principio activo, evitando así su degradación.

9.1.3 Reconstitución, aspecto y pH de las microemulsiones liofilizadas

Los viales se reconstituyeron con distinta cantidad de agua destilada dependiendo de la formulación (6,5 ml para la microemulsión A y 7 ml para la microemulsión B) y tras someterlo a agitación para favorecer la formación del sistema disperso, se procedió a determinar su aspecto externo, color, homogeneidad, presencia de partículas precipitadas y pH de la microemulsión de anfotericina B obtenida. La evaluación del pH de las microemulsiones se llevó a cabo en un pHmetro Crison micro pH 2000.

La reconstitución del producto liofilizado dio lugar a una microemulsión transparente, clara de color amarillo claro, prácticamente inodora y libre de precipitados; es decir una microemulsión semejante a la microemulsión antes de liofilizar para ambas formulaciones. La determinación del pH de la microemulsión reconstituida dio unos valores de $8,8 \pm 1,7$ para la microemulsión A y $8,9 \pm 1,3$ para la microemulsión B, con lo que no se tuvo que reajustar el pH.

9.1.4 Contenido en AmB de las microemulsiones liofilizadas

Para determinar una posible pérdida de principio activo en el proceso de liofilización, se tomaron tres muestras al azar de la bandeja del liofilizador por cada tipo de microemulsión y se analizó la cantidad de principio activo presente en ellas por las técnicas de HPLC y espectroscopía previamente descritas. De los resultados obtenidos se pudo concluir que no se producían pérdidas del principio activo en el proceso de liofilización, ya que los porcentajes de recuperación fueron de $98,4 \pm 2,9\%$ para la microemulsión A1 y $97,2 \pm 1,5\%$ para la microemulsión B.

9.1.5 Tamaño de gotícula de las microemulsiones reconstituidas

Se analizó el tamaño de gotícula de las microemulsiones reconstituidas con el fin de observar alteraciones en la estructura de la fase interna debidas al proceso de liofilización. El análisis de los tamaños de gotícula de las microemulsiones reconstituidas se realizó por PCS siguiendo la metodología previamente descrita para las microemulsiones sin liofilizar. La distribución de los tamaños de las gotículas constituyentes de la fase dispersa de las microemulsiones de anfotericina B liofilizadas y posteriormente reconstituidas se ajustaron a una curva bimodal con dos poblaciones de distinto tamaño con un diámetro medio de 46,5 nm y una polidispersidad de 0,606 para la microemulsión B y 60,6 nm y una polidispersidad de 0,608 para la microemulsión A (Figura 39).

Los resultados obtenidos indican que los procesos de liofilización y posterior reconstitución de las microemulsiones de AmB, no alteraron el tamaño de gotícula de la fase dispersa de la microemulsión.

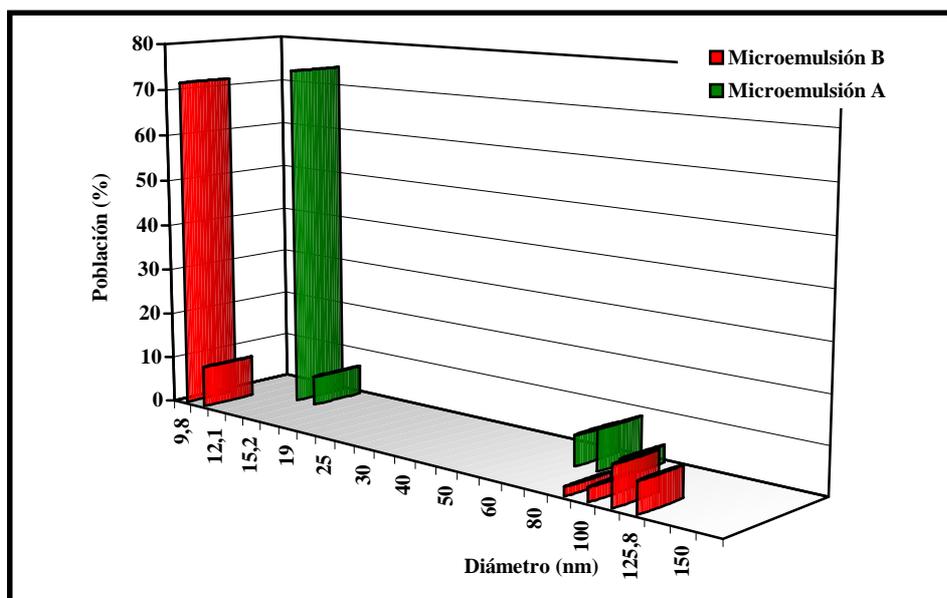


Figura 39. Distribución de los tamaños de gotícula de las microemulsiones liofilizadas A y B.

9.1.6 Comportamiento reológico y viscosidad de las microemulsiones reconstituidas.

La viscosidad de las microemulsiones liofilizadas y reconstituidas se determinó a 25°C, siguiendo el mismo método empleado para las microemulsiones sin liofilizar. Como se puede observar en la Figura 40, ambas microemulsiones presentan un comportamiento newtoniano con un coeficiente de determinación superior a 0,99, este comportamiento es semejante al de las microemulsiones sin liofilizar, aunque se observó una disminución en el valor de viscosidad de las microemulsiones liofilizadas, siendo de $17,7 \pm 5,9$ cPs para la microemulsión A y de $84,8 \pm 7,2$ cPs para la microemulsión B, lo que facilita su administración y manejabilidad en el momento de ser inyectadas.

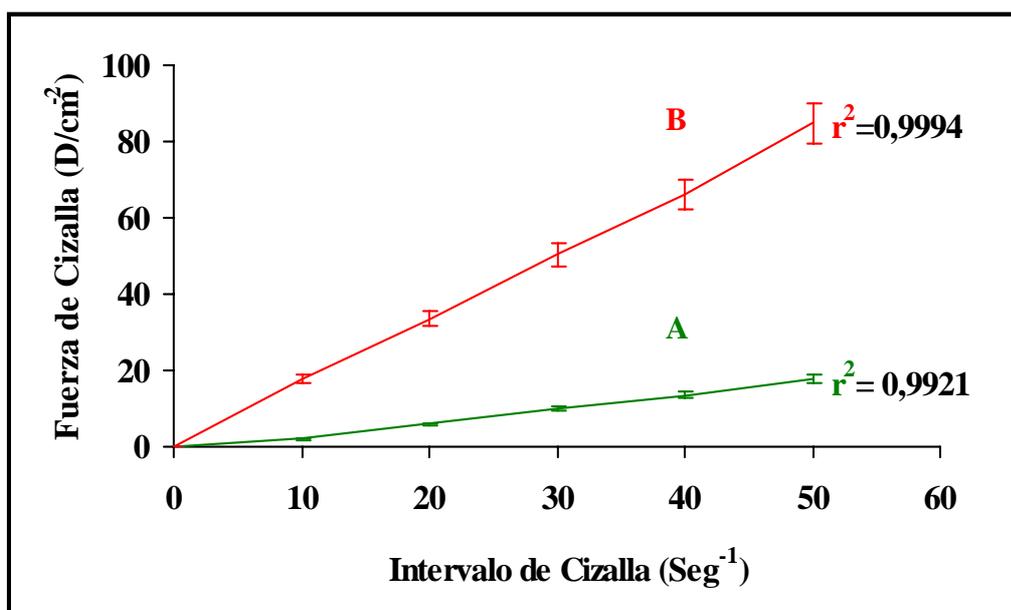


Figura 40. Comportamiento reológico de las microemulsiones liofilizadas A y B de AmB.

9.2. Estabilidad de las microemulsiones liofilizadas de AmB

Estos estudios se realizaron con el fin de determinar las condiciones óptimas de conservación de las microemulsiones liofilizadas del principio activo. Para realizar estos estudios se dispusieron muestras de los productos liofilizados en viales cerrados y protegidos de la luz durante 6 meses a las siguientes condiciones:

- Temperatura 4°C.
- Temperatura 25°C.
- Temperatura 30°C y humedad relativa del 60%.
- Temperatura 40°C y humedad relativa del 75%.

Se tomaron muestras a tiempo 0 y a los 1, 3, y 6 meses, sobre las que se evaluaron los siguientes parámetros:

Estabilidad química:

Se prepararon soluciones de las muestras tomadas a los distintos tiempos con una concentración de 2 µg/ml, que fueron filtradas por 0,45 µm, valorando por triplicado su contenido en AmB mediante HPLC; dicho contenido en principio activo debía estar comprendido entre 90-110% para que puedan ser consideradas como estables.

Estabilidad física:

- *Contenido en humedad del producto liofilizado:*

Se determinó el contenido en agua de las muestras tomadas a cada tiempo mediante el método de Karl-Fischer, utilizándose para ello el mismo aparato descrito anteriormente. El contenido en humedad de las muestras debía ser inferior al 3% para ser consideradas como estables (Moreno, M. A. 2000).

- *Propiedades organolépticas del producto liofilizado:*

Se evaluaron los cambios de color y olor de las muestras tomadas a los distintos tiempos comparándolas con la muestra estudiada al comienzo del estudio. Las muestras se consideraron como estables siempre que presentaran color amarillo cremoso claro y fueran prácticamente inodoras.

- *Reconstitución, aspecto y propiedades organolépticas del reconstituido:*

Se estudió la facilidad en la reconstitución de las muestras tomadas a los distintos tiempos, así como su aspecto, color y olor. Las muestras se consideraron como estables siempre que su reconstitución fuera rápida y diera lugar a un sistema disperso transparente, ópticamente isótropo, de color amarillo claro e inodoro.

- *pH del reconstituido:*

Se evaluaron los cambios de pH de las formulaciones reconstituidas a cada tiempo mediante el empleo de un pHmetro Crison micropH 2002. El pH de las muestras debía estar comprendido entre 8,5 y 9,5 para ser consideradas como estables.

- *Tamaño de gotícula de la fase interna del reconstituido:*

Se determinó el tamaño de las gotículas constituyentes de la fase interna de las muestras tomadas a los distintos tiempos mediante PCS siguiendo la misma metodología descrita anteriormente. Las muestras se consideraron como estables siempre que el tamaño de sus gotículas fuera inferior a 200 nm.

- *Comportamiento reológico y viscosidad del reconstituido:*

Se evaluó el comportamiento reológico determinando la viscosidad de las muestras tomadas a los distintos tiempos, utilizando para ello el mismo aparato y las mismas condiciones que se han descrito previamente. Los sistemas se consideraron como estables siempre que presentaran valores bajos de viscosidad que no afectaran a la integridad física de los mismos.

Un aumento considerable en la viscosidad de las microemulsiones es un parámetro claro que indica una desestabilización del sistema, posiblemente por un engrosamiento del tamaño de gotícula de la fase interna que hace que el roce entre las partículas sea mayor y por lo tanto que aumente la viscosidad. Por ello existe una gran relación entre el tamaño de gotícula de la fase interna y la viscosidad del sistema.

En las Tablas 28, 29, 30 y 31 se resumen los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad realizados sobre las microemulsiones A liofilizadas de AmB.

Los estudios de estabilidad a 4 °C mostraron que la microemulsión permanecía estable física y químicamente, ya que al cabo de 6 meses de almacenamiento no se observaron cambios significativos en las propiedades del liofilizado ni del reconstituido y los valores de pH, viscosidad, tamaño de gotícula y contenido en principio activo sufrieron alteraciones con el tiempo, pero se mantuvieron dentro de los límites considerados como normales.

Sin embargo para las microemulsiones almacenadas a 25 °C, al cabo de 6 meses se observaron variaciones en la tonalidad del liofilizado que adquirió un color más anaranjado lo cual está muy relacionado con el contenido en principio activo de la microemulsión, que se encontraba muy por debajo de los límites considerados como normales, entre 90 y 110%; además se observó una ligera disminución del pH que permaneció dentro del rango de la normalidad (de 8,5 a 9,5). El resto de los parámetros evaluados permanecieron dentro del rango de la normalidad y por lo tanto se puede concluir que se produce una inestabilidad química del sistema y no física.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
PROPIEDADES DEL LIOFILIZADO	✓	✓	✓	✓
CONTENIDO EN HUMEDAD (%)	0,92 ±0,03	0,76 ±0,02	1,104 ±0,05	0,289 ±0,01
PROPIEDADES DEL RECONSTITUIDO	✓	✓	✓	✓
VALOR DE PH	8,76 ±0,05	8,59 ±0,09	8,57 ±0,06	8,52 ±0,04
TAMAÑO DE GOTÍCULA (NM) (ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD)	72,40 (0,64)	54,70 (0,62)	49,20 (0,54)	71,30 (0,63)
COMPORTAMIENTO REOLÓGICO	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano
VISCOSIDAD (CPS)	11,80 ±2,60	22,10 ±5,90	23,60 ±4,30	25,70 ±8,20
CONTENIDO EN AMB (%)	98,50 ±2,10	96,46 ±1,90	95,80 ±1,60	98,70 ±1,80

Tabla 28. Resultados del estudio de estabilidad de la microemulsión A liofilizada a 4 °C.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
PROPIEDADES DEL LIOFILIZADO	✓	✓	✓	Anaranjado oscuro
CONTENIDO EN HUMEDAD (%)	0,92 ±0,03	0,67 ±0,03	1,13 ±0,02	0,37 ±0,04
PROPIEDADES DEL RECONSTITUIDO	✓	✓	✓	✓
VALOR DE PH	8,76 ±0,05	8,71 ±0,07	8,67 ±0,07	8,26 ±0,04
TAMAÑO DE GOTÍCULA (NM) (ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD)	72,40 (0,64)	72,7 (0,69)	62,10 (0,51)	66,9 (0,62)
COMPORTAMIENTO REOLÓGICO	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano
VISCOSIDAD (CPS)	11,80 ±2,60	25,7 ±0,52	23,6 ±0,89	18,9 ±2,20
CONTENIDO EN AMB (%)	98,50 ±2,10	96,31 ±1,86	93,44 ±0,75	84,50 ±3,80

Tabla 29. Resultados del estudio de estabilidad de la microemulsión A liofilizada a 25 °C.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
PROPIEDADES DEL LIOFILIZADO	✓	Amarillo oscuro	Amarillo oscuro	Anaranjado oscuro
CONTENIDO EN HUMEDAD (%)	0,92 ±0,03	0,68 ±0,02	1,41 ±0,03	0,31 ±0,04
PROPIEDADES DEL RECONSTITUIDO	✓	✓	Amarillo oscuro	Anaranjado oscuro
VALOR DE PH	8,76 ±0,05	8,52 ±0,03	8,08 ±0,05	8,00 ±0,09
TAMAÑO DE GOTÍCULA (NM) (ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD)	72,40 (0,64)	48,4 (0,60)	55,9 (0,60)	60,4 (0,68)
COMPORTAMIENTO REOLÓGICO	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano
VISCOSIDAD (CPS)	11,80 ±2,60	18,2 ±0,94	27,5 ±0,87	23,7 ±2,09
CONTENIDO EN AMB (%)	98,50 ±2,10	90,21 ±1,62	83,05 ±0,81	79,90 ±3,08

Tabla 30. Resultados del estudio de estabilidad de la microemulsión A liofilizada a 30 °C y 60 % HR

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
PROPIEDADES DEL LIOFILIZADO	✓	Anaranjado	Naranja	Naranja oscuro
CONTENIDO EN HUMEDAD (%)	0,92 ±0,03	1,04 ±0,03	1,29 ±0,06	0,60 ±0,08
PROPIEDADES DEL RECONSTITUIDO	✓	Anaranjado	Naranja	Naranja
VALOR DE PH	8,76 ±0,05	8,16 ±0,08	7,55 ±0,21	7,12 ±0,12
TAMAÑO DE GOTÍCULA (NM) (ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD)	72,40 (0,64)	44,1 (0,60)	57,2 (0,59)	63,1 (0,59)
COMPORTAMIENTO REOLÓGICO	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano
VISCOSIDAD (CPS)	11,80 ±2,60	21,4 ±0,61	27,5 ±0,67	24,9 ±1,96
CONTENIDO EN AMB (%)	98,50 ±2,10	82,00 ±2,61	81,71 ±1,62	81,69 ±2,69

Tabla 31. Resultados del estudio de estabilidad de la microemulsión A liofilizada a 40 °C y 75 % HR

En las microemulsiones almacenadas a 30°C y 60% de HR, desde el primer mes de almacenamiento se observó un oscurecimiento del liofilizado y de la microemulsión reconstituida, y también se observaron variaciones del contenido en principio activo que se encontraron en torno al 80%. También se observaron disminuciones en el pH al tercer y sexto mes de almacenamiento, pero no se alteraron ni los valores de viscosidad ni el tamaño de gotícula de la fase dispersa del reconstituido.

En las microemulsiones almacenadas a 40°C y 75% de HR, el oscurecimiento del liofilizado y del reconstituido comenzó a partir del primer mes de almacenamiento y también la reducción de los valores del contenido en AmB. El pH de la microemulsión también disminuyó al tercer y sexto mes de almacenamiento. Tampoco se observaron variaciones en el tamaño de gotícula ni en la viscosidad o contenido en humedad del liofilizado; por lo tanto el sistema parece ser físicamente estable pero no químicamente. Para comprobar estos resultados se almacenaron durante 6 meses a diferentes temperaturas y humedades relativas microemulsiones liofilizadas tipo A sin principio activo. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Tabla 32.

En estas microemulsiones no se observaron cambios organolépticos ni en los liofilizados ni en las microemulsiones reconstituidas, siendo el liofilizado de un color amarillo cremoso, de consistencia pastosa y prácticamente inodoro y el reconstituido transparente y de un color amarillo claro. Tampoco se observaron variaciones en el tamaño de gotícula de la fase interna, ni en la viscosidad ni en el comportamiento reológico de los sistemas, y el valor de pH permaneció constante con un valor aproximado de 6, ya que al no incorporar el principio activo en una solución de hidróxido sódico 0,1M el pH de la microemulsión es próximo al pH neutro. Por lo tanto el sistema sí es estable físicamente, y no químicamente estable ya que el método de incorporación de la AmB no resultó ser el óptimo con los excipientes empleados.

Parámetro analizado	25°C	30°C 60% HR	40°C 75%HR
PROPIEDADES DEL LIOFILIZADO	✓	✓	✓
CONTENIDO EN HUMEDAD (%)	1,19 ±0,10	1,01 ±0,07	0,86 ±0,07
PROPIEDADES DEL RECONSTITUIDO	✓	✓	✓
VALOR DE PH	6,21 ±0,08	6,19 ±0,07	6,24 ±0,03
TAMAÑO DE GOTÍCULA (NM) (ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD)	53,17 (0,58)	61,34 (0,57)	46,74 (0,61)
COMPORTAMIENTO REOLÓGICO	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano
VISCOSIDAD (CPS)	34,9 ±0,29	32,6 ±0,28	26,1 ±1,02
CONTENIDO EN AMB (%)	0	0	0

Tabla 32. Resultados del estudio de estabilidad de la microemulsión A liofilizada sin AmB durante 6 meses.

En las Tablas 33, 34, 35 y 36 se resumen los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad realizados sobre las microemulsiones B liofilizadas con AmB.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
PROPIEDADES DEL LIOFILIZADO	✓	✓	✓	✓
CONTENIDO EN HUMEDAD (%)	0,86 ±0,07	0,87 ±0,03	1,31 ±0,06	0,41 ±0,05
PROPIEDADES DEL RECONSTITUIDO	✓	✓	✓	✓
VALOR DE PH	8,55 ±0,08	8,57 ±0,08	8,59 ±0,05	8,22 ±0,07
TAMAÑO DE GOTÍCULA (NM) (ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD)	46,8 (0,58)	43,8 (0,60)	37,9 (0,59)	40,0 (0,67)
COMPORTAMIENTO REOLÓGICO	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano
VISCOSIDAD (CPS)	92,5 ±1,88	108,9 ±0,97	117,9 ±0,69	99,5 ±1,30
CONTENIDO EN AMB (%)	97,31 ±1,18	95,40 ±0,99	96,51 ±0,93	95,40 ±1,49

Tabla 33. Resultados del estudio de estabilidad de la microemulsión B liofilizada a 4 °C.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
PROPIEDADES DEL LIOFILIZADO	✓	✓	✓	Amarillo oscuro
CONTENIDO EN HUMEDAD (%)	0,86 ±0,07	0,90 ±0,07	0,62 ±0,04	0,14 ±0,03
PROPIEDADES DEL RECONSTITUIDO	✓	✓	✓	✓
VALOR DE PH	8,55 ±0,08	8,51 ±0,02	8,88 ±0,06	7,80 ±0,04
TAMAÑO DE GOTÍCULA (NM) (ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD)	46,8 (0,58)	46,2 (0,62)	46,1 (0,63)	49,2 (0,63)
COMPORTAMIENTO REOLÓGICO	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano
VISCOSIDAD (CPS)	92,5 ±1,88	115,4 ±1,39	86,5 ±0,94	91,3 ±1,69
CONTENIDO EN AMB (%)	97,31 ±1,18	97,2 ±1,26	98,23 ±1,69	91,9 ±0,85

Tabla 34. Resultados del estudio de estabilidad de la microemulsión B liofilizada a 25 °C.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
PROPIEDADES DEL LIOFILIZADO	✓	Amarillo oscuro	Naranja	Naranja oscuro
CONTENIDO EN HUMEDAD (%)	0,86 ±0,07	1,34 ±0,09	1,20 ±0,08	0,40 ±0,08
PROPIEDADES DEL RECONSTITUIDO	✓	✓	Naranja	Naranja oscuro
VALOR DE PH	8,55 ±0,08	8,35 ±0,04	7,75 ±0,09	7,66 ±0,07
TAMAÑO DE GOTÍCULA (NM) (ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD)	46,8 (0,58)	48,1 (0,63)	39,9 (0,59)	71,9 (0,69)
COMPORTAMIENTO REOLÓGICO	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano
VISCOSIDAD (CPS)	92,5 ±1,88	99,2 ±0,98	117,9 ±0,67	107,3 ±2,61
CONTENIDO EN AMB (%)	97,31 ±1,18	89,85 ±0,84	82,68 ±2,69	80,36 ±0,89

Tabla 35. Resultados del estudio de estabilidad de la microemulsión B liofilizada a 30 °C y 60 % HR.

Parámetro analizado	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
PROPIEDADES DEL LIOFILIZADO	✓	Anaranjado	Naranja	Naranja oscuro
CONTENIDO EN HUMEDAD (%)	0,86 ±0,07	1,19 ±0,10	1,01 ±0,07	0,86 ±0,07
PROPIEDADES DEL RECONSTITUIDO	✓	Anaranjado	Naranja	Naranja oscuro
VALOR DE PH	8,55 ±0,08	8,08 ±0,05	7,96 ±0,04	7,72 ±0,06
TAMAÑO DE GOTÍCULA (NM) (ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD)	46,8 (0,58)	45,1 (0,60)	39,5 (0,60)	43,9 (0,67)
COMPORTAMIENTO REOLÓGICO	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano
VISCOSIDAD (CPS)	92,5 ±1,88	77,9 ±0,19	94,5 ±0,89	87,8 ±1,87
CONTENIDO EN AMB (%)	97,31 ±1,18	93,70 ±0,56	85,14 ±2,34	82,64 ±0,87

Tabla 36. Resultados del estudio de estabilidad de la microemulsión B liofilizada a 40 °C y 75 % HR.

Los resultados obtenidos demostraron una estabilidad física de la microemulsión B ensayada a diferentes temperaturas (4°C, 25°C, 30°C y 40°C) y humedades relativas (60 % y 75% HR), y estabilidad química para la microemulsión B almacenada a una temperatura de 4°C. A 25°C, se produjo una disminución del contenido en principio activo, un oscurecimiento de la formulación y una disminución discreta del pH al sexto mes de almacenamiento. Para las formulaciones almacenadas a 30°C y 40°C la inestabilidad química comenzó al mes de almacenaje y se incrementó con el tiempo produciéndose una disminución del contenido en principio activo, un oscurecimiento del liofilizado y la formulación reconstituida adquirió una tonalidad anaranjada.

Para comprobar que el oscurecimiento de la microemulsión era debido a problemas de estabilidad del principio activo y no de la lecitina u otros componentes de la microemulsión, se realizó un estudio de estabilidad de la microemulsión tipo B sin AmB a diferentes temperaturas y humedades relativas durante 6 meses (Tabla 37). Al final de dicho periodo se pudo comprobar que el sistema era físicamente estable y no se produjeron variaciones ni en el tamaño de gotícula de la fase interna ni en la viscosidad y reología ni tampoco en las propiedades organolépticas ni del liofilizado ni de la microemulsión reconstituida.

Por lo tanto el estudio de estos resultados nos permitió comprobar que la microemulsión con principio activo es estable durante 6 meses a una temperatura de 4 °C sin producirse degradación de la AmB, y que el hecho de que a mayores temperaturas se produzca inestabilidad química puede ser debido a una mala incorporación del principio activo en la formulación y habría que intentar buscar nuevas formas de introducir el principio activo en el sistema con el fin de mejorar la estabilidad a largo plazo.

Parámetro analizado	25°C	30°C 60% HR	40°C 75%HR
PROPIEDADES DEL LIOFILIZADO	✓	✓	✓
CONTENIDO EN HUMEDAD (%)	0,65 ±0,08	0,59 ±0,06	0,92 ±0,05
PROPIEDADES DEL RECONSTITUIDO	✓	✓	✓
VALOR DE PH	6,68 ±0,04	6,71 ±0,03	6,50 ±0,07
TAMAÑO DE GOTÍCULA (NM) (ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD)	60,38 (0,55)	43,78 (0,59)	57,36 (0,67)
COMPORTAMIENTO REOLÓGICO	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano
VISCOSIDAD (cPs)	96,14 ±0,30	88,96 ±0,19	100,81 ±1,01
CONTENIDO EN AMB (%)	0	0	0

Tabla 37. Resultados del estudio de estabilidad de la microemulsión A liofilizada sin AmB durante 6 meses.

9.3. Estabilidad de las microemulsiones reconstituidas de AmB a la temperatura.

Se evaluó la estabilidad a la temperatura de las microemulsiones de AmB, obtenidas después de la reconstitución de los productos liofilizados, con el objeto de establecer las condiciones óptimas de conservación de dichos sistemas, así como para determinar el intervalo máximo de tiempo que podría transcurrir entre la reconstitución de la formulación y su administración, sin que se produjesen fenómenos de degradación del principio activo o de la forma farmacéutica.

Los estudios de estabilidad se realizaron durante 72 horas, ya que, considerando que la administración de la formulación recientemente reconstituida debe realizarse en perfusión intravenosa lenta (4-8 horas), 3 días suponían un margen de seguridad suficientemente amplio ante la existencia de anomalías o retrasos en la administración de dicho preparado.

Para realizar el estudio, se procedió a la reconstitución con agua destilada del producto liofilizado, almacenándose posteriormente las microemulsiones reconstituidas a las temperaturas de 8, 25, y 40°C. Durante todo el estudio se observó si se producían alteraciones en el aspecto externo del reconstituido, con aparición de precipitados, o alteraciones en el color o en la transparencia de las muestras almacenadas. Se tomaron muestras al inicio y al final del estudio, sobre las que se evaluaron los siguientes parámetros:

Estabilidad química:

Se prepararon soluciones de las muestras tomadas a los distintos tiempos con una concentración de 2 µg/ml, que fueron filtradas por 0,45 µm y valoradas por triplicado respecto a su contenido en AmB mediante HPLC. El contenido en principio activo de las muestras, debía estar comprendido entre 90-110 % para ser consideradas como estables.

Estabilidad física:

Se evaluaron los cambios en el tamaño de gotícula de la fase interna, comportamiento reológico y viscosidad, aspecto (color, olor, transparencia e isotropía óptica) y pH de los sistemas reconstituidos, comparándolos con los resultados observados en las muestras estudiadas al comienzo del ensayo. Las microemulsiones fueron consideradas como estables siempre que presentaran un tamaño de gotícula inferior a 200 nm, comportamiento reológico newtoniano y baja viscosidad, valores de pH comprendidos entre 8,5 y 9,5, color amarillo claro de la microemulsión reconstituida, así como un aspecto totalmente transparente y ópticamente isótropo.

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad de las microemulsiones reconstituidas frente a la temperatura, aparecen reflejados en la Tabla 38.

T ^a	Tiempo (horas)	Parámetros analizados			
		pH	Tamaño (nm) (IP)	Viscosidad (cPs)	Contenido en principio activo (%)
Formulación A					
8°C	0	8,9 ± 0,04	49,4 (0,57)	18,9 ± 2,3	98,01 ± 1,68
	72	8,7 ± 0,13	63,9 (0,61)	23,4 ± 1,7	99,35 ± 1,48
25°C	0	8,9 ± 0,04	49,4 (0,57)	18,9 ± 2,3	98,01 ± 1,68
	72	8,6 ± 0,15	63,5 (0,55)	29,1 ± 1,9	97,36 ± 2,71
40°C	0	8,9 ± 0,04	49,4 (0,57)	18,9 ± 2,3	98,01 ± 1,68
	72	8,5 ± 0,09	98,6 (0,76)	22,8 ± 2,4	101,26 ± 1,90
Formulación B					
8°C	0	8,8 ± 0,07	36,3 (0,57)	89,6 ± 5,6	97,92 ± 2,01
	72	8,9 ± 0,10	58,9 (0,62)	98,3 ± 4,6	99,51 ± 1,86
25°C	0	8,8 ± 0,07	36,3 (0,57)	89,6 ± 5,6	97,92 ± 2,01
	72	8,5 ± 0,08	89,3 (0,69)	99,2 ± 3,7	102,10 ± 1,01
40°C	0	8,8 ± 0,07	36,3 (0,57)	89,6 ± 5,6	97,92 ± 2,01
	72	8,7 ± 0,13	72,5 (0,66)	101,7 ± 2,8	96,32 ± 1,79

Tabla 38. Resultados del estudio de estabilidad a la temperatura de las microemulsiones reconstituidas de AmB.

Al cabo de 72 horas las microemulsiones siguieron siendo estables, independientemente de la temperatura a la que se almacenaran, aunque se pudieron observar pequeñas variaciones en el sistema, pero estas variaciones se encontraron dentro del rango de normalidad. Se pudo observar en ambas formulaciones un ligero incremento en el tamaño de gotícula y en el índice de polidispersidad, y también un discreto incremento en la viscosidad, pero ni en el pH ni en el contenido en principio activo, ni en las propiedades organolépticas de la formulación se observaron cambios y por lo tanto estas formulaciones permanecieron estables en un periodo de 72 horas tras su reconstitución.

9.4. Estabilidad de las microemulsiones reconstituidas de AmB a los ciclos de congelación-descongelación.

Se trata de un estudio de estabilidad muy característico de las microemulsiones, que se realizó con objeto de evaluar la integridad física y química de los sistemas reconstituidos en las condiciones de máximo choque térmico. Para realizar el estudio, se procedió a la reconstitución del producto liofilizado con agua destilada, sometiendo posteriormente a las microemulsiones reconstituidas a 3 ciclos alternos, de 24 horas, de 25°C y -5°C durante 7 días.

Se tomaron muestras inicialmente y a los 7 días, en las que se evaluaron los siguientes parámetros:

Estabilidad química:

Se prepararon soluciones de las muestras tomadas a los distintos tiempos con una concentración de 2 µg/ml, que fueron filtradas por 0,45 µm y valoradas por triplicado respecto a su contenido en AmB mediante HPLC. El contenido en principio activo de las muestras, debía estar comprendido entre 90-110 % para ser consideradas como estables.

Tiempo (días)	Parámetros analizados			
	pH	Tamaño (nm) (IP)	Viscosidad (cPs)	Contenido en principio activo (%)
Formulación A				
0	8,6 ± 0,07	52,7 (0,56)	23,7 ± 3,8	99,36 ± 1,02
7	8,7 ± 0,08	65,0 (0,65)	31,5 ± 1,9	99,01 ± 2,45
Formulación B				
0	9,0 ± 0,03	60,7 (0,58)	90,5 ± 6,1	99,37 ± 1,64
7	8,8 ± 0,12	69,9 (0,64)	99,6 ± 5,0	97,36 ± 2,08

Tabla 39. Resultados del estudio de estabilidad de las microemulsiones reconstituidas de AmB a los ciclos de congelación-descongelación.

Estabilidad física:

Se evaluaron los cambios en el tamaño de gotícula de la fase interna, comportamiento reológico y viscosidad, aspecto (color, olor, transparencia e isotropía óptica) y pH de los sistemas reconstituidos, comparándolos con los resultados observados en las muestras estudiadas al comienzo del ensayo. Las microemulsiones fueron consideradas como estables siempre que presentaran un tamaño de gotícula inferior a 200 nm, comportamiento reológico newtoniano y baja viscosidad, valores de pH comprendidos entre 8,5 y 9,5, el color amarillo claro de la microemulsión reconstituida, así como un aspecto totalmente transparente y ópticamente isótropo.

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad a los ciclos de congelación-descongelación de las microemulsiones reconstituidas aparecen reflejados en la Tabla 39. Como se puede observar a partir de los datos indicados, ambas formulaciones presentaron un ligero incremento en el tamaño de gotícula y en el índice de polidispersidad y también un discreto incremento en la viscosidad de las microemulsiones, pero dentro del rango de la normalidad y por lo tanto los sistemas se mantuvieron física y químicamente estables hasta el final del estudio, sin observarse alteraciones en el color, la consistencia y la transparencia de las mismas.

9.5. Estabilidad de las microemulsiones reconstituidas de AmB en el test de centrifugación.

Este estudio tuvo como objeto la evaluación de la integridad física y química de las microemulsiones reconstituidas cuando son expuestas a la acción de una fuerza centrífuga.

Una vez reconstituido el producto liofilizado con agua destilada, se procedió a la centrifugación durante 20 minutos a una velocidad de 9.000 r.p.m. Las muestras se tomaron al comienzo y al final del estudio, analizándose sobre ellas los siguientes parámetros:

Estabilidad química:

Se prepararon soluciones de las muestras con una concentración de 2 µg/ml, que fueron filtradas por 0,45 µm y se valoró por triplicado en ellas su contenido en AmB mediante HPLC. El contenido en principio activo de las muestras, debía estar comprendido entre 90-110 % para ser consideradas como estables.

Estabilidad física:

Se evaluaron los cambios en el tamaño de gotícula de la fase interna y en el aspecto (color, olor, transparencia e isotropía óptica) de los sistemas reconstituidos, comparándolos con los resultados observados en las muestras estudiadas al comienzo del ensayo. Las microemulsiones fueron consideradas como estables siempre que presentaran un tamaño de gotícula inferior a 200 nm, color amarillo claro de la microemulsión reconstituida, así como un aspecto totalmente transparente y ópticamente isótropo.

Los resultados obtenidos en el test de centrifugación aparecen reflejados en la Tabla 40.

Tiempo (minutos)	Parámetros analizados			
	pH	Tamaño (nm) (IP)	Viscosidad (cPs)	Contenido en principio activo (%)
Formulación A				
0	8,8 ± 0,03	45,6 (0,59)	19,9 ± 4,2	97,60 ± 1,35
20	8,5 ± 0,12	61,0 (0,48)	28,6 ± 1,7	99,36 ± 2,66
Formulación B				
0	9,1 ± 0,08	61,8 (0,59)	103,7 ± 7,1	101,56 ± 2,45
20	9,0 ± 0,10	48,9 (0,60)	98,7 ± 3,7	98,39 ± 3,01

Tabla 40. Resultados del estudio de estabilidad de las microemulsiones reconstituidas de AmB al test de centrifugación.

Los resultados obtenidos en el test de centrifugación mostraron que las microemulsiones permanecieron estables durante todo el estudio, no presentando alteraciones fuera del rango de la normalidad en las propiedades organolépticas ni en las propiedades físicoquímicas.

ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS DE MICROEMULSIONES DE ANFOTERICINA B

Mediante los estudios farmacocinéticos se conoce la evolución temporal de las concentraciones de fármaco en el interior del organismo. En el caso de las microemulsiones de AmB determinar la cinética de distribución y eliminación del fármaco es de gran importancia para poder conocer su posible mecanismo de acción. Por ello se realizaron estudios farmacocinéticos en animales de experimentación usando diferentes dosis y modos de administración de estas nuevas formulaciones de AmB. Se realizó un estudio piloto con el objetivo de obtener información para la realización del muestreo definitivo.

Las formulaciones empleadas para estos estudios fueron:

- **Microemulsiones de AmB conteniendo como tensioactivo Brij[®] 96V.** Estas microemulsiones han sido descritas y caracterizadas en el capítulo anterior. De todas las microemulsiones formuladas se seleccionaron para los estudios farmacocinéticos aquellas cuya apariencia y propiedades fisicoquímicas fueron más aceptables. Por ello se seleccionaron las microemulsiones A y B con una proporción de Brij[®] 96V/lecitina 1,5:1.
- **Microemulsiones de AmB conteniendo como tensioactivo Polisorbato 80.** Estas microemulsiones fueron descritas por Moreno, M. A. (Moreno, M. A. 2000), y se caracterizan por ser altamente estables y muy poco tóxicas ($LD_{50} = 4$ mg/kg) en comparación con la formulación comercial Fungizona[®] ($LD_{50} = 1,5$ mg/kg). Tanto sus propiedades físicas, tales como aspecto, viscosidad o tamaño de gotícula de la fase interna, o pH, y sus propiedades químicas tales como el contenido en principio activo, son muy semejantes a las microemulsiones realizadas con el tensioactivo Brij[®] 96V, la diferencia principal está en su composición, ya que estas microemulsiones poseen una relación polisorbato 80/lecitina 2:1. Con el fin de simplificar la comprensión de los estudios realizados y los resultados obtenidos, se denominó a esta nueva formulación microemulsión C.
- **Formulación comercial Fungizona[®].** A pesar de los numerosos estudios realizados sobre la farmacocinética de dicha formulación, son pocos los estudios realizados en conejos. Por ello, con el fin de comparar los resultados farmacocinéticos obtenidos para las microemulsiones de AmB, fue necesario estudiar el comportamiento farmacocinético de esta formulación denominada formulación F.

Todos los estudios farmacocinéticos se realizaron en conejos y se dividió el trabajo en tres apartados:

- a) Se realizó un primer ensayo de las formulaciones tras la administración de una dosis de 1mg/kg en bolus i.v. con el fin de realizar un estudio comparativo del comportamiento farmacocinético de las distintas formulaciones.

- b) Se realizó un segundo estudio con diferentes dosis de la microemulsión C administradas por vía i.v. en bolus, con el fin de comprobar si la farmacocinética es dosis dependiente.
- c) Por último se realizó un estudio comparativo de la microemulsión C y la formulación comercial F (Fungizona[®]), tras ser administradas por perfusión i.v. en una dosis de 1 mg/kg durante 4 días en conejos con el fin de realizar un estudio comparativo de ambas formulaciones.

Los estudios realizados con animales de experimentación se realizaron en el Animalario de la UCM, que es un Centro de Asistencia a la Investigación suministrador y usuario de animales de experimentación, que cumple con los requerimientos legislativos relativos a la experimentación animal (D. C. 86/609/CEE; R. D. 223/1988; O. M. 13/X/1989).

1. ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA EN BOLUS EN DOSIS UNICA

1.1. Animales de experimentación

Para realizar los estudios farmacocinéticos se emplearon como animales de experimentación, conejos machos albinos New Zealand, de un peso comprendido entre 2,5 y 3 kg. Los animales fueron alojados en jaulas independientes a una temperatura de 25°C y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, y recibieron comida y bebida sin restricciones durante todo el estudio excepto en el momento en el que se les realizó la administración del fármaco, y durante la toma de muestras sanguíneas. Los animales tuvieron un periodo de adaptación en el animalario de cuatro días previo al estudio farmacocinético.

La administración intravenosa del fármaco tipo bolus en un volumen de 2,5 ml, se realizó por la vena marginal de la oreja izquierda, y la toma de muestras, un volumen de 2 ml, se realizó por la vena lateral de la oreja derecha, con el fin de evitar posibles interferencias entre la dosis administrada y las muestras plasmáticas extraídas. Para cada tipo de formulación y cada dosis se emplearon 3 conejos y los análisis de muestras plasmáticas se hicieron por triplicado .

1.2. Dosis de fármaco administradas

Para la realización del estudio farmacocinético de la administración i.v. en bolus de formulaciones de AmB, se comparó el comportamiento farmacocinético de las microemulsiones de AmB con la formulación comercial F, a la dosis de 1 mg/kg, ya que ésta es la dosis máxima tolerada para la formulación comercial.

Las microemulsiones, cuya concentración en AmB para las 3 formulaciones ensayadas era de 2 mg/ml, se diluyeron en suero glucosado en una concentración al 5% p/v hasta obtener una solución con una concentración de 1 mg/kg, teniendo en cuenta el peso de cada animal (2,75 kg) y el volumen de inyección (2,5 ml). La esterilización de las muestras se hizo por filtración esterilizante mediante el uso de filtros de diámetro medio de 0,22 µm, y como queda reflejado en capítulos previos, esta esterilización no afectó al tamaño de gotícula interno de los sistemas dispersos, pero sí a la concentración de principio activo incorporado, por ello se tuvo que reajustar la dosis teniendo en cuenta la cantidad de principio activo retenido en el filtro.

En el caso de la formulación F, la dosis a administrar se preparó según las instrucciones del fabricante, usando agua estéril para la resuspensión seguida de una posterior dilución en suero glucosado fisiológico al 5% p/v, hasta obtener la concentración de fármaco adecuada a las dosis a administrar que fue de 1 mg/kg.

1.3. Extracción y análisis de las muestras

Se tomaron muestras plasmáticas heparinizadas a los 5 y 30 minutos y 1, 2, 3, 4, 7 y 24 horas tras la administración i.v. del fármaco a una dosis de 1 mg/kg. El análisis de las muestras plasmáticas aparece reflejado en la Figura 41. Se tomaron las muestras plasmáticas heparinizadas, y se sometieron a una centrifugación de 5500 r.p.m. durante 20 minutos. El sobrenadante se congeló y se conservó a una temperatura de - 20°C hasta su análisis cromatográfico. En el momento del análisis se tomó el sobrenadante y se le añadió 2 volúmenes de metanol por cada volumen de plasma, con el fin de provocar la precipitación de las proteínas plasmáticas y así evitar posibles interferencias en el análisis cromatográfico. Las muestras se sometieron a una centrifugación de 5500 r.p.m. durante 20 minutos y una vez finalizado el proceso se tomó el sobrenadante, que tras ser filtrado por un filtro de diámetro de poro de 0,45 µm, se inyectó en el cromatógrafo para analizar su contenido en AmB.

Tras finalizar el ensayo los animales fueron sacrificados mediante la administración intravenosa de 4 ml de pentobarbital sódico por la vena marginal de la oreja izquierda.

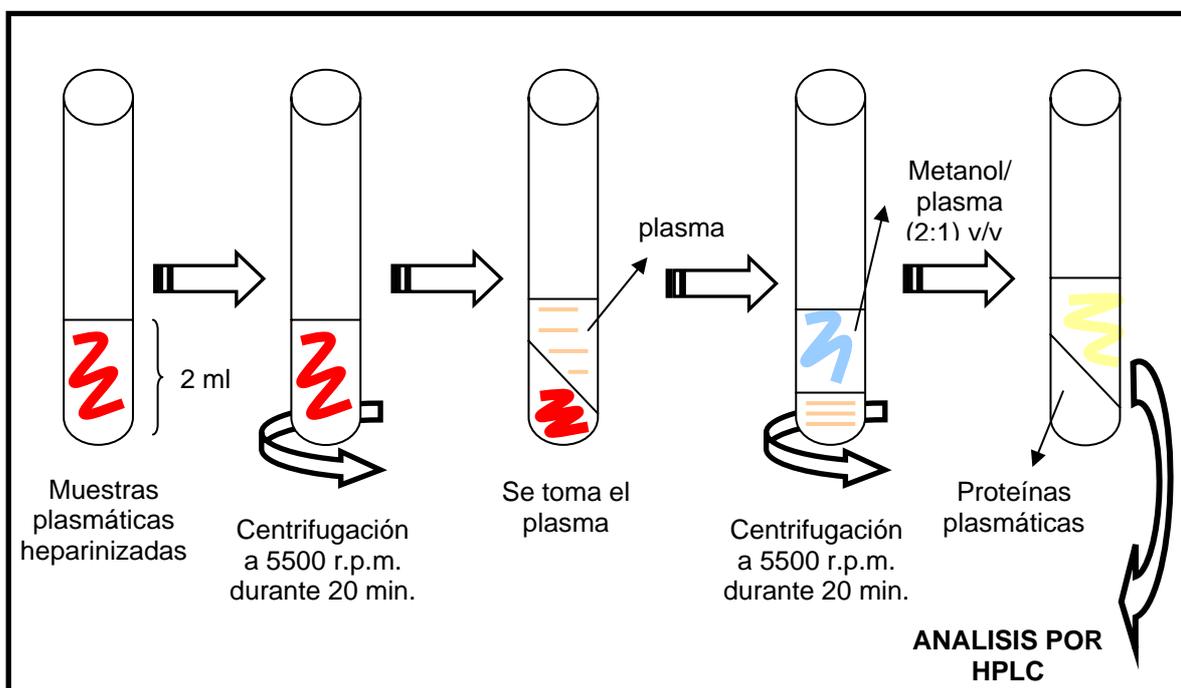


Figura 41. Esquema de la preparación de muestras plasmáticas previo a su análisis por HPLC.

El método empleado para la determinación cuantitativa del principio activo en plasma aparece descrito en la sección de validaciones de métodos analíticos al inicio de esta Memoria.

1.4. Análisis farmacocinético

Se realizó un análisis farmacocinético compartimental y no compartimental de los datos mediante el uso del programa farmacocinético WIN NONLIN 2.1. Para realizar dicho estudio se analizaron los datos de cada conejo individualmente y posteriormente se calculó la media de los parámetros farmacocinéticos, que son los que aparecen reflejados en las Tablas.

Para el análisis no compartimental de los datos se empleó el método log-trapezoidal con extrapolación hasta infinito recomendado por Chiou para calcular el área bajo la curva (AUC), el área bajo el momento de la curva (AUMC) y el tiempo medio de residencia (MRT) (Chiou, W. L. et al. 1978).

Para el análisis bicompartimental de los datos se empleó el algoritmo de minimización de Gauss-Newton-Levenberg-Hartley, que permite la obtención de resultados con datos experimentales poco numerosos y es un método muy rápido recomendado para el ajuste de modelos sencillos. El peso de cada valor observado (W_i) se calculó como el valor inverso a la varianza del valor observado (Z_i):

$$W_i = \frac{1}{\text{var}(Z_i)}$$

Se emplearon dos métodos para definir la precisión del ajuste farmacocinético: el Criterio de información de Akaike (AIC) y el Criterio de Schwartz (SC).

Las ecuaciones para calcular dichos métodos son:

$$AIC = n \ln(O_{WLS}) + 2p$$

$$SC = n \ln(O_{WLS}) + p \ln(n)$$

donde p es el número de parámetros del modelo farmacocinético seleccionado (bicompartimental, tricompartimental...), n es el número de observaciones realizadas y O_{WLS} es la función objetiva de mínimos cuadrados ponderados (weighted least-squares). Esta función se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$O_{WLS} = \sum_{i=1}^n W_i (Z_i - Y_i)^2$$

donde Z_i es el valor observado, Y_i es el valor predicho y W_i es el peso de los valores observados.

1.5. Resultados obtenidos

A continuación aparecen reflejados en las Tablas 41, 42, 43 y 44 los resultados obtenidos en el estudio farmacocinético para cada una de las formulaciones de AmB en conejos a una dosis de 1 mg/kg in bolus por vía endovenosa.

Resultados del estudio farmacocinético de la **formulación F** tras la administración de una dosis de 1 mg/kg en bolus i.v. a 3 conejos.

	<u>Conejo 1</u>	<u>Conejo 2</u>	<u>Conejo 3</u>	<u>MEDIA DE LOS 3</u> <u>CONEJOS</u>	
Tiempo (h)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Desviación estándar
0,083	2,98	3,62	3,71	3,42	0,40
0,5	1,67	1,74	2,07	1,82	0,21
1	1,25	1,64	1,78	1,54	0,28
2	1,29	1,43	1,17	1,29	0,13
3	0,98	0,93	0,90	0,94	0,04
4	1,11	0,89	0,87	0,95	0,14
7	1,03	0,77	0,65	0,80	0,19
24	0,57	0,47	0,34	0,45	0,11

Tabla 41. Resultados del estudio farmacocinético de la formulación F tras la administración de una dosis de 1 mg/kg en bolus i.v. a tres conejos.

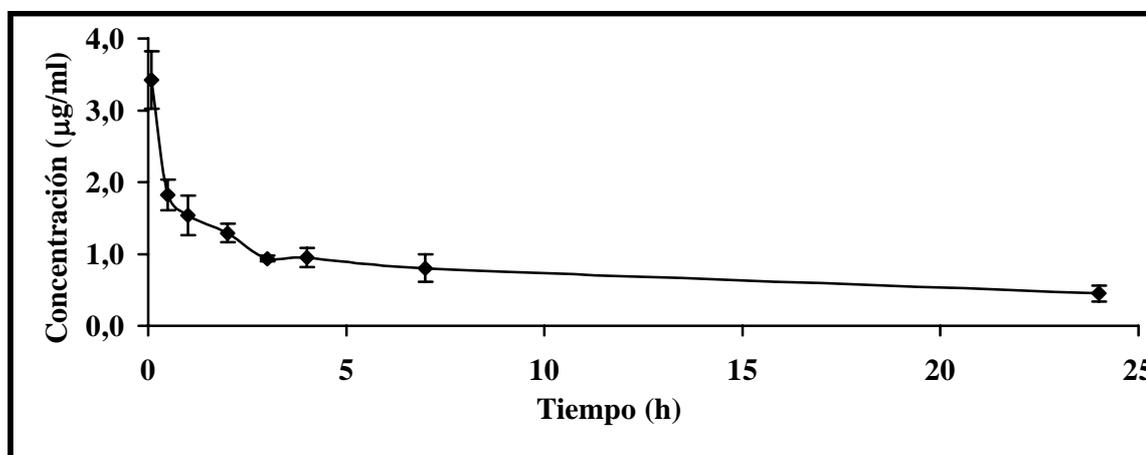


Figura 42. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la formulación F.

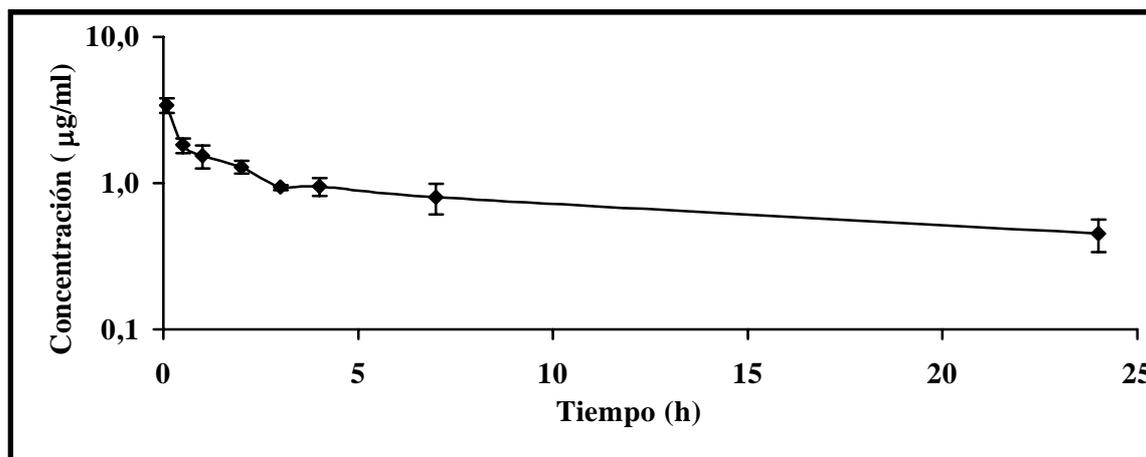


Figura 43. Representación semilogarítmica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la formulación F.

En la Figura 42 se muestra que tras la administración i.v. de 1 mg/kg de la formulación F, se observó una cinética biexponencial con una primera fase de eliminación rápida seguida de una segunda fase de eliminación más lenta. La concentración máxima media observada fue de $3,42 \mu\text{g/ml}$ y la mínima de $0,45 \mu\text{g/ml}$.

Mediante la representación semilogarítmica de los valores medios de concentraciones plasmáticas frente al tiempo (Figura 43), se puede observar una distribución bifásica en la que los parámetros se ajustan a dos líneas rectas, cuyo punto de inflexión se produce a las tres horas de la administración del fármaco. Este tipo de representación informa sobre la distribución del fármaco en el organismo, y en este caso se puede decir que presenta una distribución bicompartimental.

Resultados del estudio farmacocinético de la microemulsión C tras la administración de una dosis de 1 mg/kg en bolus i.v. a 3 conejos.

	<u>Conejo 1</u>	<u>Conejo 2</u>	<u>Conejo 3</u>	<u>MEDIA DE LOS 3 CONEJOS</u>	
Tiempo (h)	Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Desviación estándar
0,083	3,16	2,31	3,38	2,75	0,56
0,5	2,10	2,04	1,65	1,95	0,21
1	2,42	1,60	1,44	1,73	0,44
2	2,27	1,46	0,99	1,48	0,53
3	1,63	1,01	1,02	1,14	0,31
4	-	0,86	1,01	0,90	0,09
7	1,08	0,57	0,90	0,75	0,26
24	0,39	0,24	0,30	0,29	0,07

Tabla 42. Resultados del estudio farmacocinético de la microemulsión C, tras la administración de una dosis de 1 mg/kg en bolus i.v. a tres conejos.

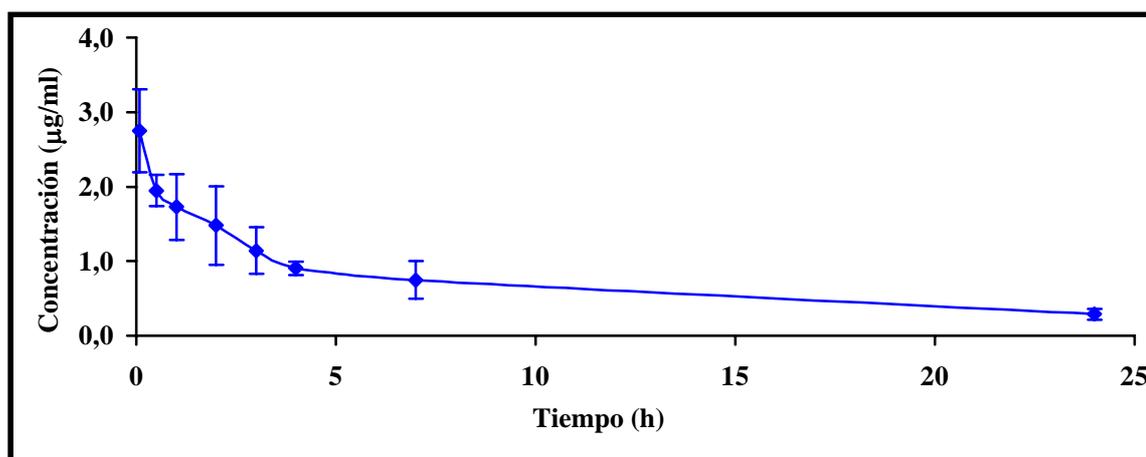


Figura 44. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración. en bolus i.v. de la microemulsión C.

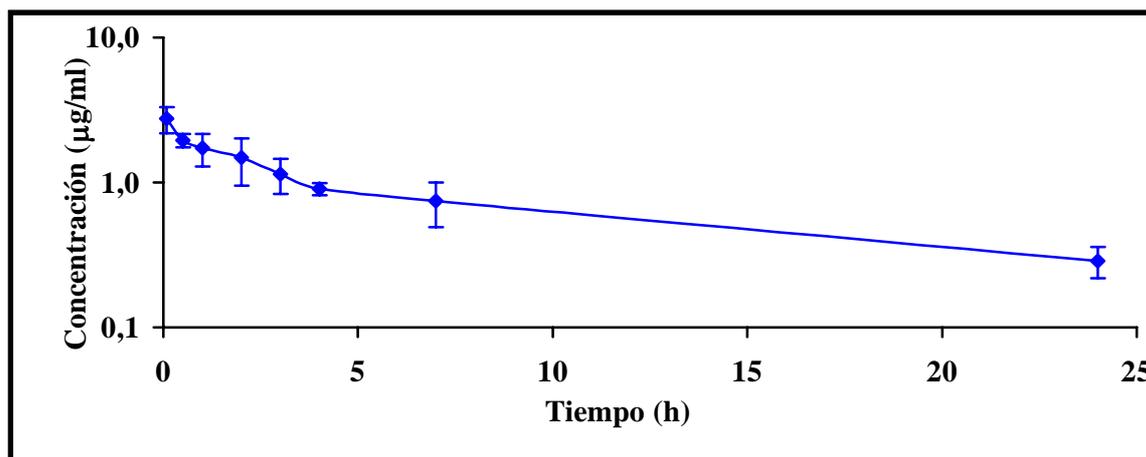


Figura 45. Representación semilogarítmica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración, en bolus i.v. de la microemulsión C.

Tras la administración i.v. de 1 mg/kg de la microemulsión C, se observó una cinética biexponencial con una primera fase de eliminación rápida seguida de una segunda fase de eliminación más lenta. La concentración máxima media observada fue de 2,75 µg/ml y la mínima de 0,29 µg/ml (Figura 44).

Mediante la representación semilogarítmica de los valores medios de concentraciones plasmáticas frente al tiempo (Figura 45) se puede observar una distribución bifásica en la que los parámetros se ajustan a dos líneas rectas de pendiente muy semejante, cuyo punto de inflexión se produce a las cuatro horas de la administración del fármaco. Este tipo de representación informa sobre la distribución del fármaco en el organismo, y en este caso se puede decir que presenta una distribución bicompartimental. Debido a un error en el transporte de las muestras se produjo una caída de un tubo de ensayo y por lo tanto en el conejo 1 no se pudo obtener el valor de la concentración plasmática a las cuatro horas.

Resultados del estudio farmacocinético de la **microemulsión B** tras la administración de una dosis de 1 mg/kg en bolus i.v. a 3 conejos.

	<u>Conejo 1</u>	<u>Conejo 2</u>	<u>Conejo 3</u>	<u>MEDIA DE LOS 3 CONEJOS</u>	
Tiempo (h)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Desviación estándar
0,083	8,94	9,89	8,11	8,97	0,89
0,5	6,86	7,64	6,72	7,07	0,49
1	5,95	6,16	5,78	5,96	0,19
2	5,31	5,16	5,26	5,24	0,08
3	3,78	4,11	3,72	3,87	0,21
4	3,36	3,53	3,43	3,44	0,08
7	1,83	2,02	1,15	1,66	0,45
24	0,72	1,01	0,74	0,82	0,16

Tabla 43. Resultados del estudio farmacocinético de la microemulsión B, tras la administración de una dosis de 1 mg/kg en bolus i.v. a tres conejos.

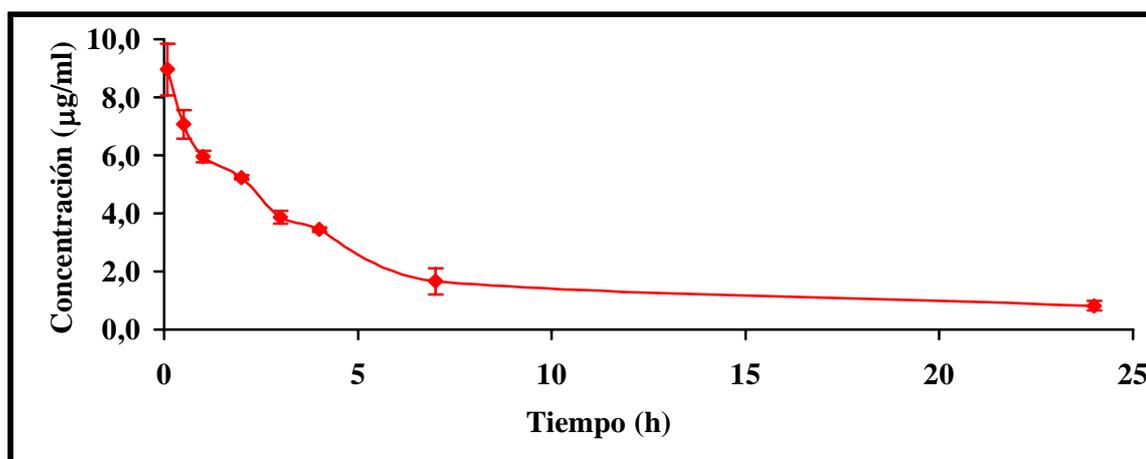


Figura 46. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión B.

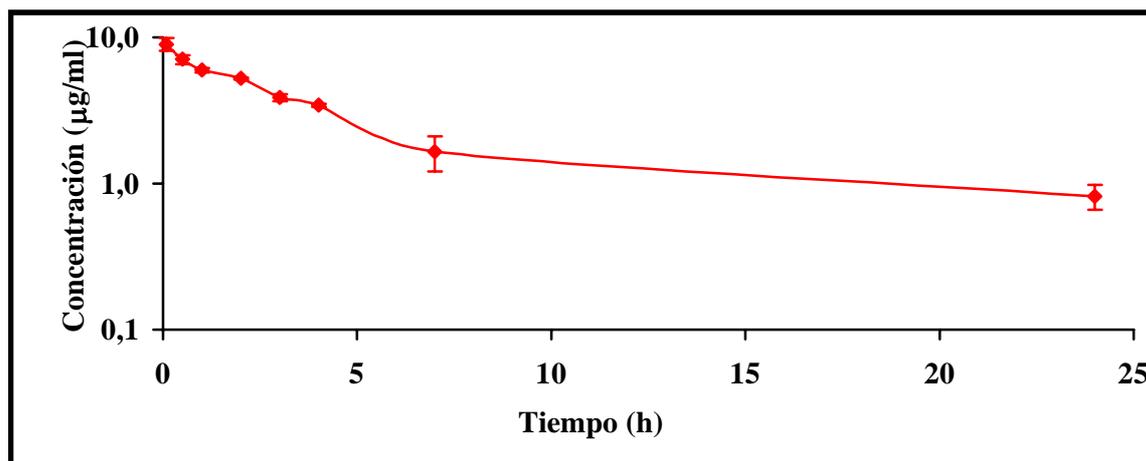


Figura 47. Representación semilogarítmica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión B.

En la Figura 46 se representan las concentraciones frente al tiempo después de la administración de 1 mg/kg en bolus i.v. de la microemulsión B y se observó una cinética biexponencial con una primera fase de eliminación rápida seguida de una segunda fase de eliminación más lenta. La concentración máxima media observada fue de 8,97 µg/ml y la mínima de 0,82 µg/ml.

En la representación logarítmica de los valores medios de concentraciones plasmáticas frente al tiempo (Figura 47) se puede observar una distribución bifásica en la que los parámetros se ajustan a dos líneas rectas de pendiente muy semejante, cuyo punto de inflexión se produce a las siete horas de la administración del fármaco. Este tipo de representación informa sobre la distribución del fármaco en el organismo, y en este caso se puede decir que presenta una distribución bicompartimental.

Resultados del estudio farmacocinético de la **microemulsión A** tras la administración de una dosis de 1 mg/kg en bolus i.v. a 3 conejos.

	<u>Conejo 1</u>	<u>Conejo 2</u>	<u>Conejo 3</u>	<u>MEDIA DE LOS 3 CONEJOS</u>	
Tiempo (h)	Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Desviación estándar
0,083	4,11	4,42	5,41	4,64	0,68
0,5	2,15	2,88	3,30	2,78	0,58
1	2,83	2,54	1,91	2,44	0,47
2	1,95	1,49	1,70	1,71	0,23
3	0,75	1,28	1,54	1,18	0,40
4	0,64	1,16	1,15	0,98	0,29
5,5	0,44	0,61	0,80	0,61	0,18
7	-	0,34	0,55	0,44	0,14
24	0,29	0,26	0,29	0,28	0,02

Tabla 44. Resultados del estudio farmacocinético de la microemulsión A, tras la administración de una dosis de 1 mg/kg en bolus i.v. a tres conejos.

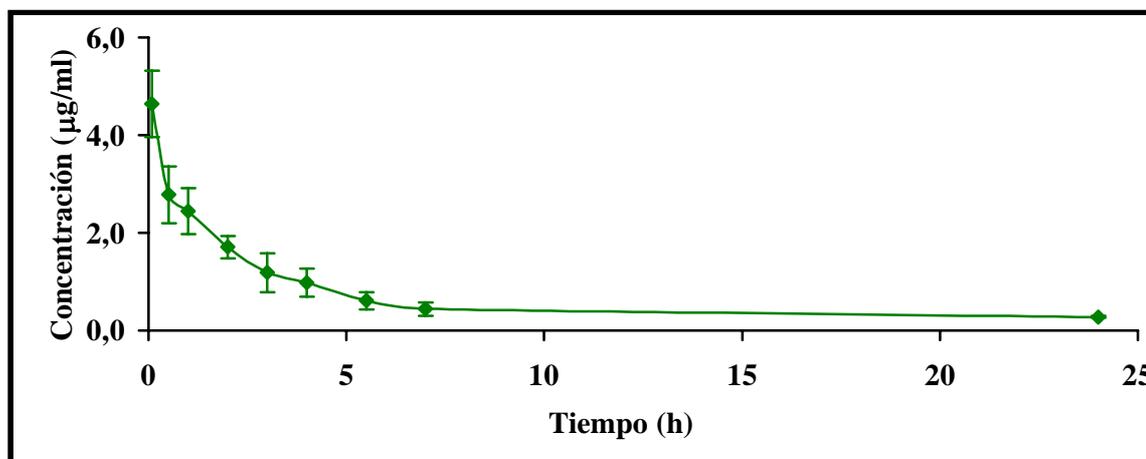


Figura 48. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración i.v. in bolus de la microemulsión A.

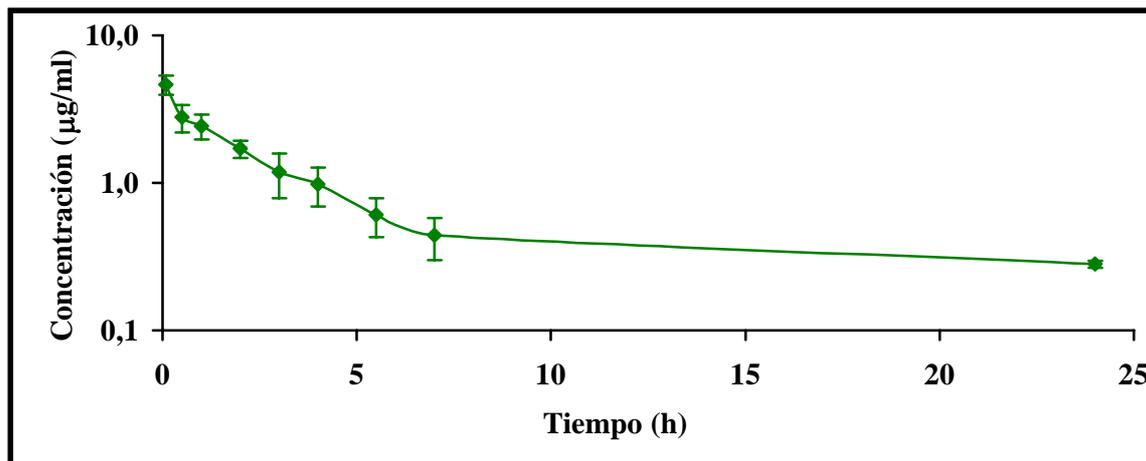


Figura 49. Representación semilogarítmica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión A.

En la Figura 48 se representtan las concentraciones frente al tiempo después de la administración i.v. de 1 mg/kg de la microemulsión A. Se observó una cinética biexponencial con una primera fase de eliminación rápida seguida de una segunda fase de eliminación más lenta. La concentración máxima media observada fue de 4,64 µg/ml y la mínima de 0,28 µg/ml.

Mediante la representación semilogarítmica de los valores medios de concentraciones plasmáticas frente al tiempo (Figura 49) se puede observar una distribución bifásica en la que los parámetros se ajustan a dos líneas rectas, cuyo punto de inflexión se produce a las siete horas de la administración del fármaco. Este tipo de representación informa sobre la distribución del fármaco en el organismo, y en este caso se puede decir que presenta una distribución bicompartimental.

A continuación se representa en las Figuras 50 y 51 los valores medios de las concentraciones plasmáticas obtenidos para todas las formulaciones, en escala normal y logarítmica.

Como se puede observar, los valores plasmáticos más altos se obtienen con la microemulsión B, en cambio el resto de las formulaciones presentan un perfil muy semejante, variando tan sólo la concentración máxima obtenida siendo superior para la formulación A. Estos cambios en los valores plasmáticos de las formulaciones pueden estar directamente relacionados con la composición de las mismas, teniendo todas ellas una viscosidad muy semejante excepto la formulación B, que es la que presenta unos valores superiores de concentración plasmática. Sin embargo la pendiente de la fase terminal es muy semejante para la formulación F, y las microemulsiones A y B, y es más acusada para la formulación C. La distribución de las formulaciones en el organismo sigue un comportamiento análogo presentando todas ellas una distribución bifásica con una primera fase de eliminación lenta seguida de otra mucho más rápida.

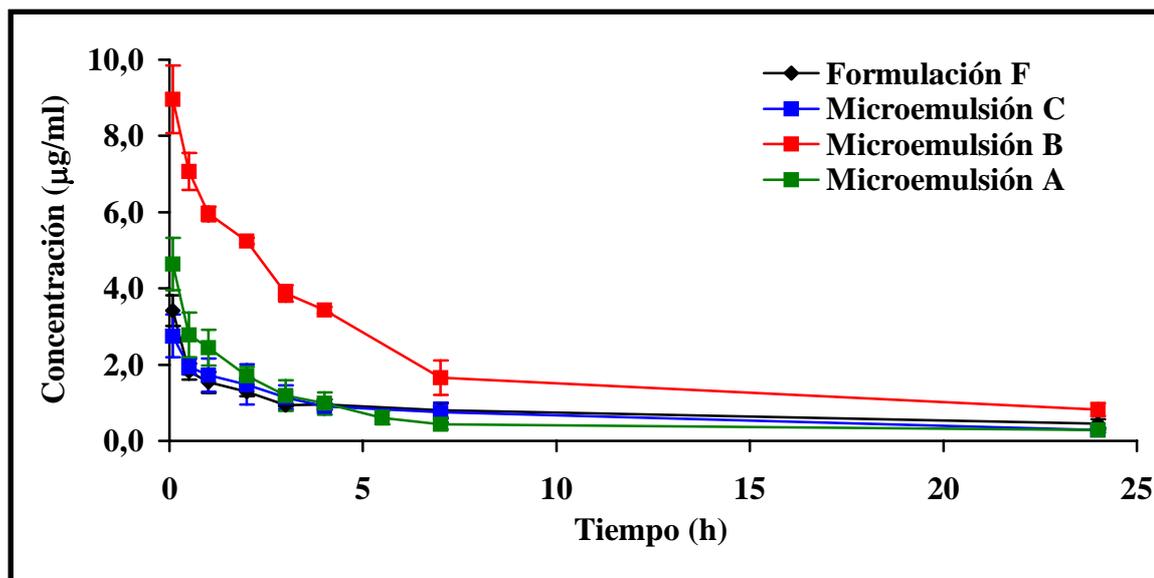


Figura 50. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de las 4 formulaciones.

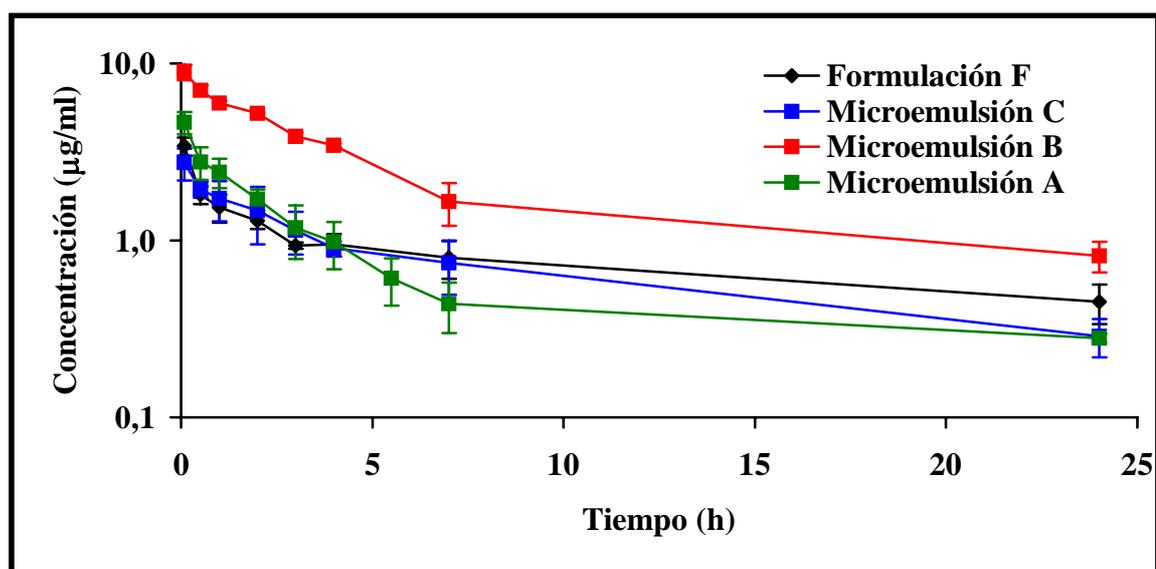


Figura 51. Representación semilogarítmica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de las 4 formulaciones.

1.6. Análisis no compartimental

Uno de los principios fundamentales de la farmacología es la relación en el tiempo que existe entre el efecto del fármaco y la cantidad del mismo en el lugar de acción. La cantidad de fármaco presente en el organismo está directamente relacionada con los procesos de absorción, distribución y eliminación del fármaco, y también con la naturaleza del principio activo y el régimen de dosificación empleado. Los estudios farmacocinéticos

permiten diseñar regímenes de dosificación y frecuentemente facilitan la investigación de la cinética y los mecanismos de acción de los fármacos.

El primer estudio que debe ser realizado para evaluar datos de concentración plasmática frente al tiempo debe ser un estudio no compartimental en el que se calculen los siguientes parámetros: AUC, AUMC, C_{\max} y λ , en inglés este primer análisis se denomina SHAM, ya que se calcula la pendiente (slope, λ), la altura máxima (height, C_{\max}), el área bajo la curva (area, AUC) y el momento (moment, AUMC).

PARÁMETROS	ECUACIONES
<p>SEMIVIDA PLASMÁTICA ($t_{1/2}$)</p> <p>Representa el tiempo que tarda la concentración plasmática del fármaco en reducirse a la mitad</p>	$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{ke}$
<p>ÁREA BAJO LA CURVA (AUC)</p> <p>Es la superficie delimitada por el eje de abscisas y la curva de concentración plasmática entre $t=0$ y $t=\infty$. Esta superficie caracteriza la cantidad de medicamento que ha entrado en el organismo.</p>	$AUC_0^\infty = AUC_0^t + AUC_t^\infty$ $AUC_0^t = \sum_0^t \left[\frac{C_{n-1} - C_n}{\ln C_{n-1} - \ln C_n} \cdot (t_n - t_{n-1}) \right]$
<p>ACLARAMIENTO PLASMÁTICO (CL)</p> <p>Representa el volumen de plasma totalmente depurado de fármaco por unidad de tiempo. Caracteriza la importancia de diferentes factores responsables de la eliminación del fármaco. El aclaramiento total corresponde a la suma de más aclaramientos en relación con los distintos procesos de eliminación.</p>	$CL = \frac{D}{AUC_0^\infty}$
<p>TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT)</p> <p>Es el tiempo que, en promedio, permanece en forma inalterada una molécula de fármaco en el organismo, durante su tránsito por él.</p>	$MRT = \frac{AUMC_0^\infty}{AUC_0^\infty}$
<p>VOLUMEN DE DISTRIBUCIÓN (V)</p> <p>Es el parámetro que relaciona la cantidad de fármaco en el organismo con la concentración plasmática. Existe una relación constante entre la concentración plasmática C y la cantidad de fármaco administrado D; $V=D/C$.</p>	$V = MRT \cdot CL$

Tabla 45. Definición y ecuaciones de los parámetros farmacocinéticos obtenidos en el estudio no compartimental de las distintas formulaciones de AmB.

Las ecuaciones para calcular dichos parámetros aparecen descritas en la Tabla 45, empleando el método log-trapezoidal para el cálculo del AUC.

Los resultados obtenidos en el análisis no compartimental aparecen reflejados en la Tabla 46.

PARÁMETROS	FORMULACIONES			
	F	A	B	C
AUC ($\mu\text{gh/ml}$)	32,28 \pm 7,31	24,28 \pm 2,31	65,90 \pm 15,69	21,89 \pm 5,17
AUMC ($\mu\text{gh}^2/\text{ml}$)	895,96 \pm 324,15	577,61 \pm 198,22	944,12 \pm 363,64	355,75 \pm 99,78
MRT (h)	27,10 \pm 4,80	23,78 \pm 8,11	14,32 \pm 4,03	16,23 \pm 0,20
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	3,89 \pm 0,48	5,13 \pm 0,92	9,40 \pm 1,01	2,92 \pm 0,54
V_{ss} (l)	2,12 \pm 0,21	2,44 \pm 0,64	0,54 \pm 0,03	1,85 \pm 0,40
CL (l/h)	0,08 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	0,037 \pm 0,006	0,11 \pm 0,02
λ (h^{-1})	0,035 \pm 0,005	0,032 \pm 0,005	0,049 \pm 0,008	0,057 \pm 0,002
T_{1/2} (h)	19,84 \pm 3,14	21,20 \pm 5,17	14,14 \pm 3,62	12,32 \pm 0,48

Tabla 46. Parámetros farmacocinéticos no compartimentales de las diferentes formulaciones de AmB administradas a conejos en una dosis de 1 mg/kg vía i.v. en bolus (media \pm DE).

El valor de concentración máxima en plasma tras la administración del fármaco (C_{max}), presentó un valor máximo de 9,40 $\mu\text{g/ml}$ para la microemulsión B siendo menor en la microemulsión A, y fue la microemulsión C aquella que presentó el menor valor siendo de 2,92 $\mu\text{g/ml}$. La formulación comercial F presentó un valor intermedio entre la microemulsión A y C. El valor de la pendiente terminal λ fue mayor para la microemulsión C y B y tomó valores menores para las formulaciones A y F. Esto puede observarse en la Figura 51, viendo el paralelismo existente entre las rectas terminales de las formulaciones. El valor de λ representa la velocidad de eliminación del fármaco de la circulación sanguínea, a mayores valores de la pendiente, más rápida es la eliminación y menor es la semivida del fármaco en sangre ($T_{1/2}$). Para la formulación C la semivida plasmática es de 12,32 h en comparación con la formulación A cuya semivida es de 21,20 h. Otro parámetro muy relacionado con la eliminación del fármaco de la circulación sanguínea es el MRT (tiempo medio de residencia o Mean Residence Time) que también presenta valores menores para la formulación C y B (16,23 y 14,32 h respectivamente) en comparación con el resto de las formulaciones que presentan valores superiores siendo máximo para la formulación F (27,10 h). Por el contrario el aclaramiento plasmático es mayor para la formulación C (0,11 l/h) en comparación con el resto de las formulaciones.

La cantidad de fármaco que pasa a circulación sistémica con el tiempo es diferente para la formulación F y C, y también se observan diferencias entre ambas formulaciones respecto al CL, como se observa en la Tabla 46. El comportamiento farmacocinético de la formulación C puede estar directamente relacionado con la diferente composición de la formulación, ya que a semejanza de otras nuevas formulaciones de AmB, presentando en su estructura componentes similares tales como la α -fosfatidilcolina, en el mecanismo de eliminación que presenta puede estar relacionado el sistema reticuloendotelial (Boswell, G. W. et al. 1998). Lo cual explicaría para la formulación C este mayor aclaramiento y menor tiempo medio de residencia.

Sin embargo la formulación A posee un comportamiento farmacocinético muy semejante al de la formulación comercial F y como posteriormente se verá en los estudios de toxicidad aguda en dosis múltiple, esta formulación no presentará mejores características toxicológicas que la formulación F, y esto puede ser debido a una mala incorporación de la AmB a la formulación, lo cual incrementa la cantidad de principio activo libre en plasma, y por lo tanto el sistema no presenta diferencias farmacocinéticas y toxicológicas significativas.

La microemulsión B presenta una distribución en sangre muy diferente del resto de las formulaciones ya que los valores plasmáticos son mucho más elevados. Esta formulación no parece ser fagocitada por el sistema reticuloendotelial, debido a los niveles en plasma tan elevados que presenta, y como se verá en estudios posteriores de toxicidad subaguda en dosis múltiple, las características toxicológicas de esta formulación son muy semejantes a las de la formulación comercial F.

1.7. Análisis compartimental

La farmacocinética, mediante el análisis compartimental, permite desarrollar modelos para predecir el comportamiento y la distribución del fármaco tras su administración. En el análisis compartimental de nuevas formulaciones de AmB se evaluaron modelos bi y tricompartmentales para describir la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas del principio activo (Janknegt, R. et al. 1992).

En la bibliografía aparecen descritos dos modelos farmacocinéticos para describir el comportamiento de las formulaciones de AmB en el organismo. Estos dos modelos son el modelo bicompartimental y tricompartmental (Hutchaleelaha, A. et al. 1997, Atkinson, A. J. et al. 1978). Con el fin de averiguar qué modelo se ajustaba mejor a los perfiles de las distintas formulaciones en plasma, se emplearon dos métodos que permiten seleccionar el mejor modelo farmacocinético para cada formulación; estos métodos fueron el AIC o Criterio de Información de Akaike y el SC o Criterio de Schwarz. También se puede emplear el test F pero diversos estudios han comprobado la mejor efectividad de los otros dos métodos en comparación con este último ya que este test tiende a seleccionar el modelo más simple aun cuando modelos más complejos son los correctos, y por ello no se utilizó (Ludden, T. M. et al. 1994). Los valores de AIC y SC obtenidos para los diferentes modelos evaluados aparecen recogidos en la Tabla 47, y reflejan el mayor ajuste de un modelo cuanto menor sea el valor obtenido.

Formulación	Criterio de Información de Akaike (AIC)		Criterio de Schwarz (SC)	
	Bicompartmental	Tricompartmental	Bicompartmental	Tricompartmental
A	-14,84	24,45	-14,05	25,64
B	-23,79	-28,01	-23,47	-27,53
C	-20,07	5,86	-19,75	6,34
F	-14,61	11,18	-14,29	11,65

Tabla 47. Valores de AIC y SC para las formulaciones A, B, C y F.

En todas las formulaciones estudiadas el modelo que mejor se ajustaba fue el bicompartmental, y a continuación quedan reflejados en las Figuras 52-59 los modelos teóricos bicompartmental y tricompartmental junto con los datos experimentales.

Para la formulación B ambos modelos presentaron valores muy semejantes, pero frente a valores muy aproximados, siempre es más correcto elegir el modelo más sencillo para describir los valores experimentales.

- **Formulación F**

Como se puede observar en la Figura 52, el modelo bicompartmental define más correctamente el comportamiento de la formulación F en el organismo, a pesar de que los datos de la concentración plasmática a los 5 minutos y a la media hora tras la administración del fármaco no se predicen con exactitud con el modelo teórico.

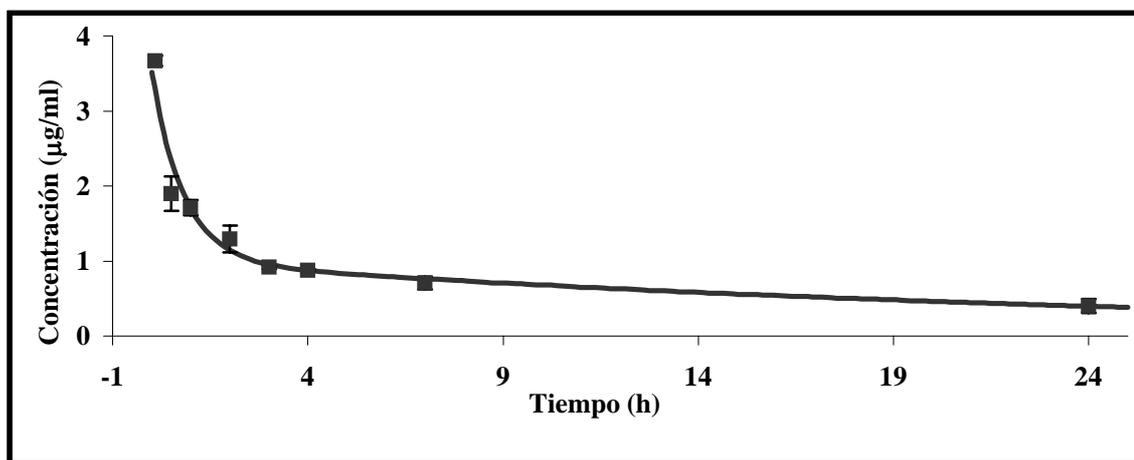


Figura 52. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la formulación F, junto con las predicciones según un modelo bicompartmental.

Por el contrario en el modelo tricompartmental ninguno de los valores plasmáticos comprendidos entre las 0,5 y 7 horas se ajustan al modelo teórico, quizás el modelo verdadero pudiera ser el tricompartmental pero no se disponen de datos suficientes

para describir la primera fase de eliminación del fármaco. Así mismo los parámetros farmacocinéticos calculados mediante el modelo tricompartmental presentan unos coeficientes de variación muy elevados entorno al 200% en algunos parámetros por ejemplo el parámetro A tiene un coeficiente de variación de 264,62%, y el parámetro β de 276,60%, y por ello se consideró el modelo bicompartmental como el más adecuado para este fármaco (Figura 53).

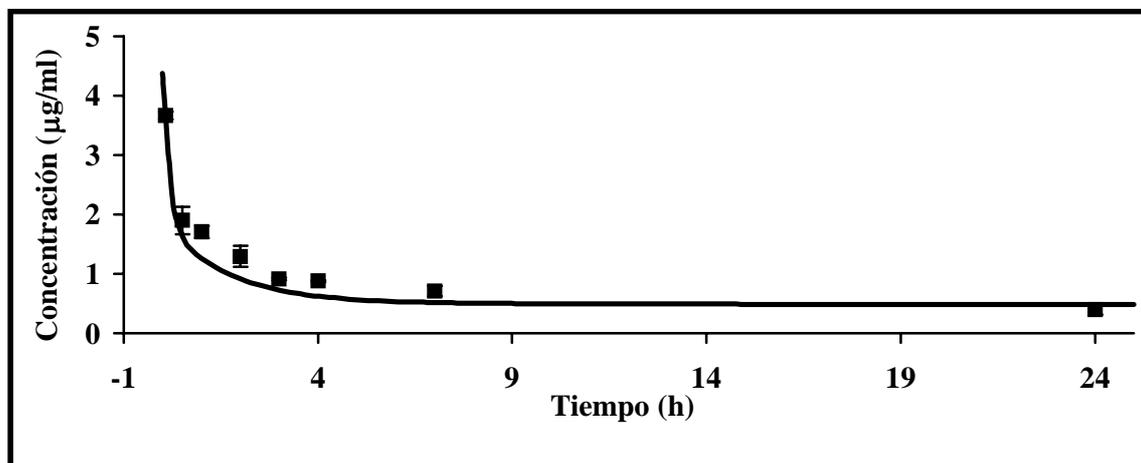


Figura 53. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la formulación F, junto con las predicciones según un modelo tricompartmental.

• Microemulsión C

Para la microemulsión C el modelo bicompartmental es el que describe más correctamente la disposición de este fármaco en el organismo (Figura 54).

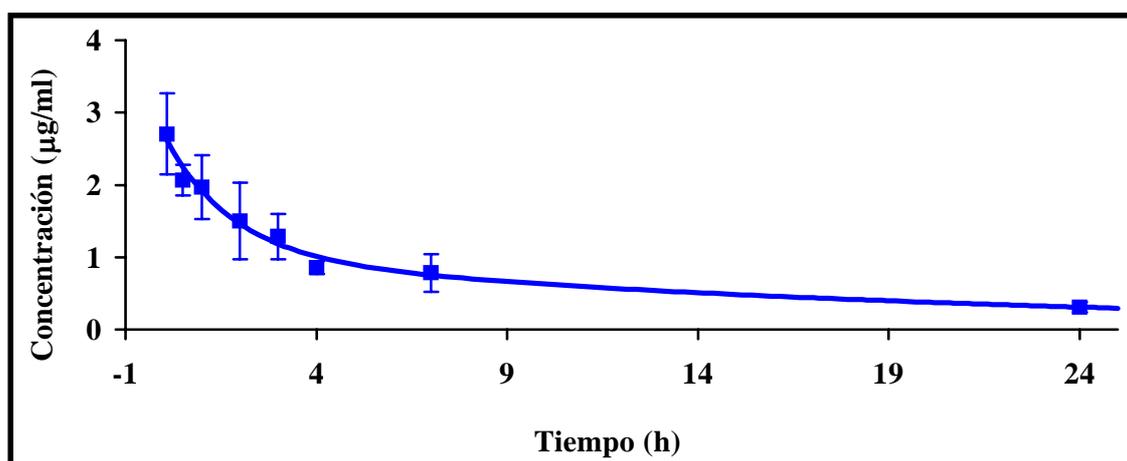


Figura 54. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión C, junto con las predicciones según un modelo bicompartmental.

Esto no sólo se puede observar gráficamente viendo la aproximación de los valores experimentales a los datos teóricos sino también a partir de los parámetros AIC y SC. Se observa claramente que para el modelo tricompartmental estos parámetros adquieren unos valores muy elevados indicando que el modelo no se ajusta correctamente a los datos experimentales (Figura 55).

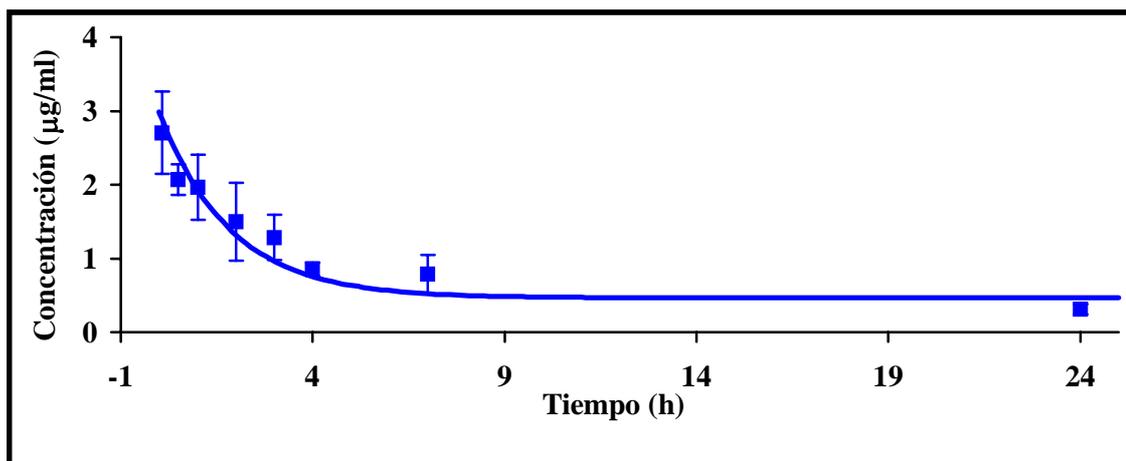


Figura 55. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión C, junto con las predicciones según un modelo tricompartmental.

- **Microemulsión A**

Para la microemulsión A el modelo bicompartimental es el que describe más correctamente la disposición de este fármaco en el organismo, ya que el modelo tricompartmental presenta unos valores muy elevados de AIC y SC (24,45 y 25,64 respectivamente)(Figuras 56 y 57). Para esta formulación el modelo bicompartimental no se ajusta tan correctamente a los datos experimentales como en otras formulaciones debido principalmente al dato de concentración plasmática obtenido a los 5 minutos, que según el modelo teórico debería ser inferior, entorno a los 4 µg/ml.

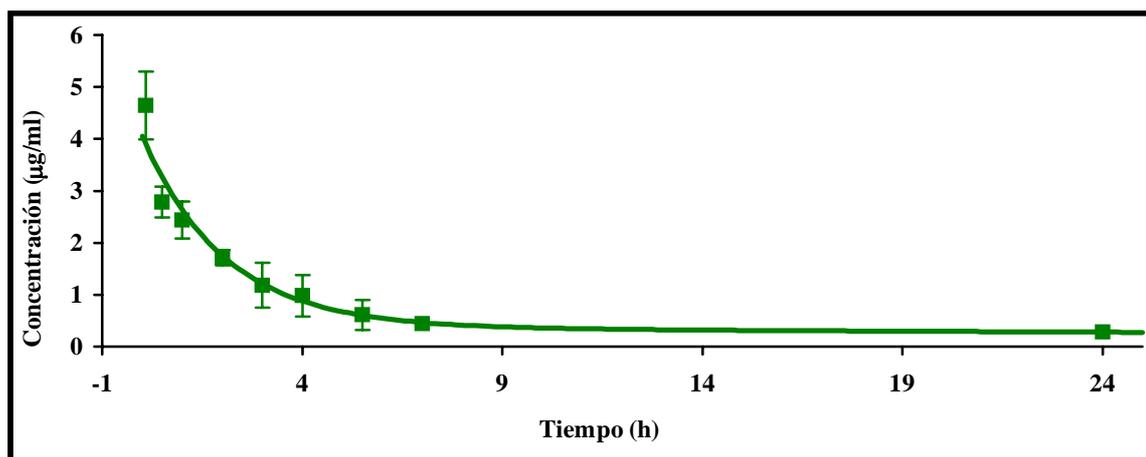


Figura 56. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión A, junto con las predicciones según un modelo bicompartimental.

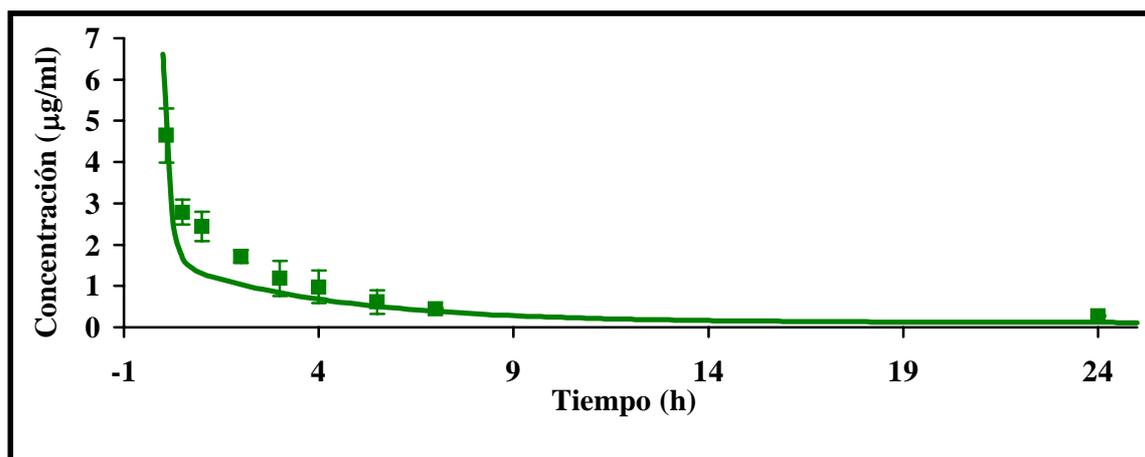


Figura 57. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión A, junto con las predicciones según un modelo tricompartmental.

• Microemulsión B

Para la microemulsión B el modelo tricompartmental es el que se ajusta más correctamente a los datos teóricos. Esto se puede observar gráficamente o comparando los valores de AIC y SC para ambos modelos, siendo ligeramente inferiores para el modelo tricompartmental. Pero como la diferencia existente entre ambos modelos era muy pequeña, se escogió el modelo bicompartimental para definir el comportamiento del fármaco en el organismo, no sólo por ser más sencillo, sino porque los coeficientes de variación de los parámetros calculados según el modelo tricompartmental eran muy elevados, (para el parámetro γ el coeficiente de variación es de 256,94%, y para el parámetro α es de 173,38%), y por lo tanto se prefirió el modelo bicompartimental cuyos coeficientes de variación no superaban el 45% (Figuras 58 y 59).

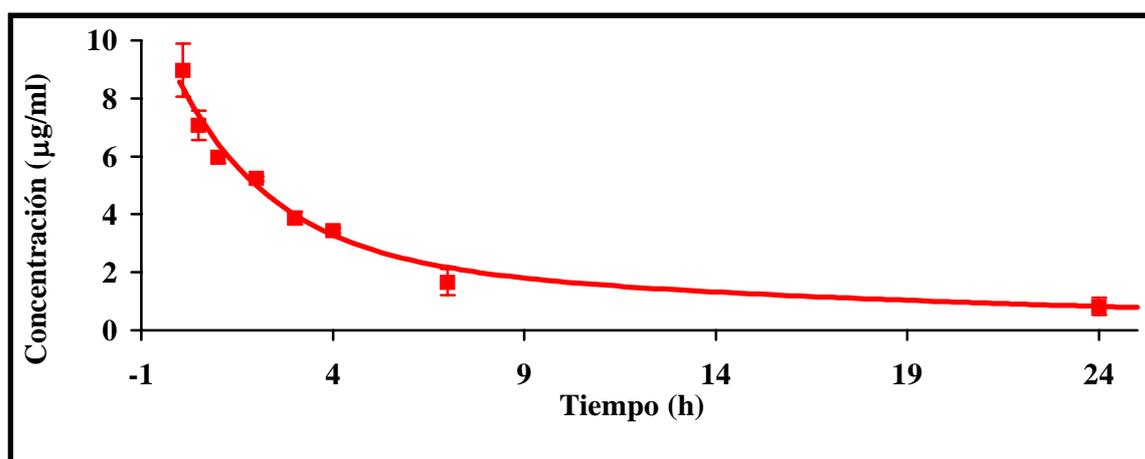


Figura 58. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión B, junto con las predicciones según un modelo bicompartimental.

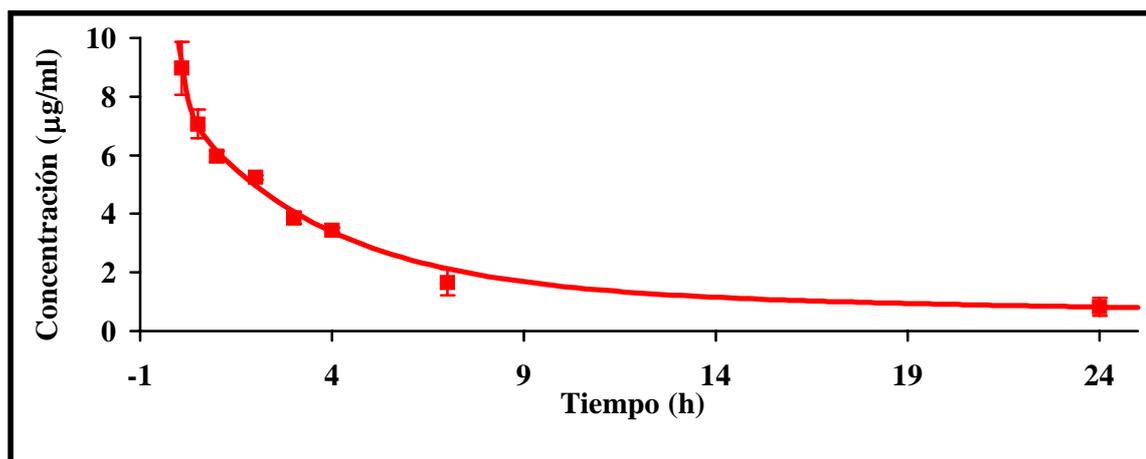


Figura 59. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión B, junto con las predicciones según un modelo tricompartimental.

A continuación se representan las curvas de concentraciones plasmáticas frente al tiempo simuladas de todas las formulaciones siguiendo un modelo bicompartmental, en escala normal y logarítmica (Figuras 60 y 61).

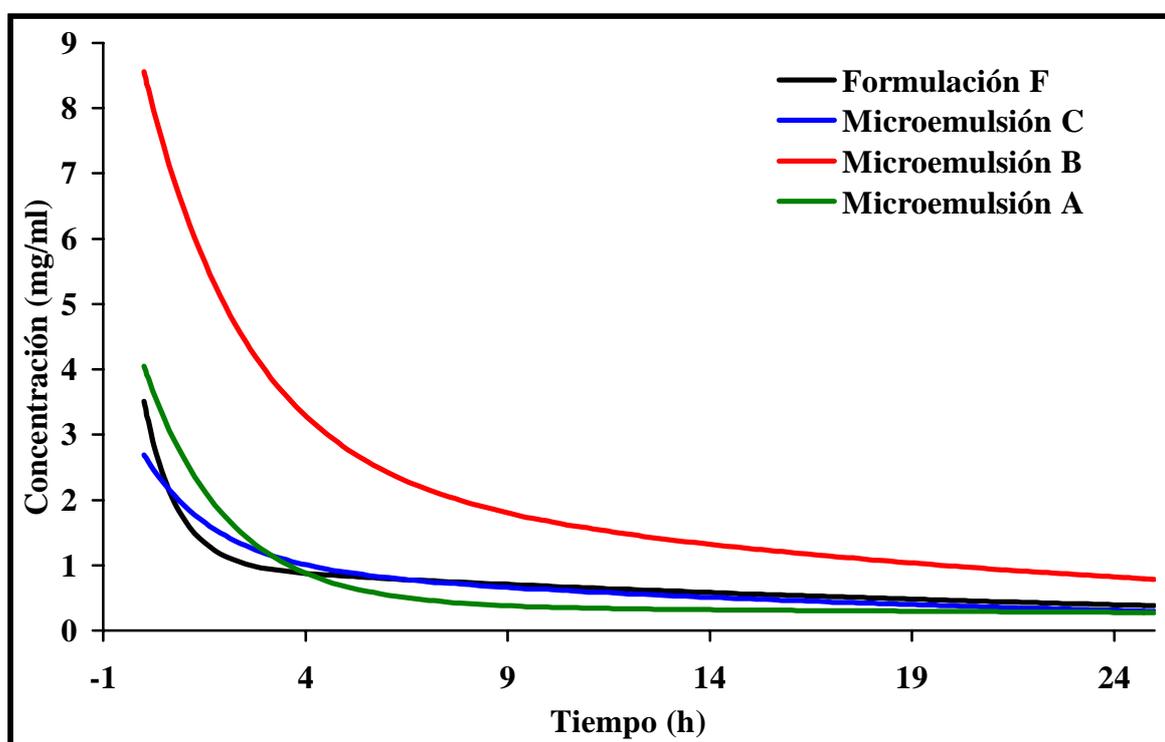


Figura 60. Representación gráfica de los datos teóricos simulados a un modelo bicompartmental de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de todas las formulaciones.

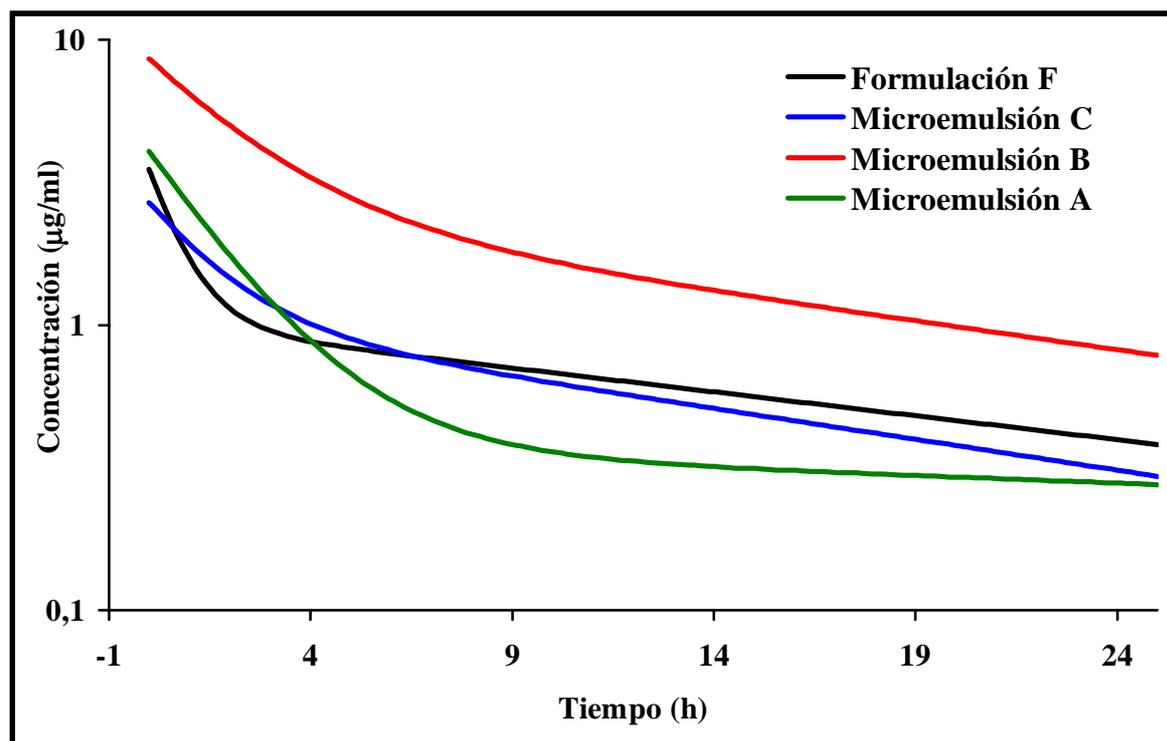


Figura 61. Representación gráfica de los datos teóricos simulados a un modelo bicompartimental de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de todas las formulaciones.

En la Figura 61 se puede apreciar la diferencia de pendientes de las fases terminales de las formulaciones siendo muy parecidas para las microemulsiones C y B, menor para la formulación F y prácticamente de pendiente 0 para la formulación A, lo que indica su reducida velocidad de eliminación. También se aprecia claramente la diferencia de pendientes de las fases iniciales siendo la de mayor pendiente la de la microemulsión F, seguida de la microemulsión A. Las microemulsiones C y B poseen una pendiente inicial muy semejante y ligeramente inferior al resto de las formulaciones.

Los parámetros farmacocinéticos estimados con el modelo bicompartimental aparecen reflejados en la Tabla 48.

Para todas las formulaciones el parámetro α es muy superior al parámetro β , y es mayor para la formulación F, que es la que presenta una pendiente superior en la fase inicial. El resto de las formulaciones poseen un valor del parámetro α muy semejante. Por el contrario, la pendiente de la fase terminal, llamada β , y el aclaramiento plasmático es mayor para la microemulsión C que para el resto de las formulaciones, lo cual indica una mayor velocidad de eliminación que puede estar relacionada con la captación de dicha formulación por el sistema reticuloendotelial, al igual que ocurre con otras formulaciones lipídicas de AmB (Janknegt, R. et al. 1992, Boswell, G. W. et al. 1998).

El valor del parámetro β es prácticamente igual en todas las formulaciones al parámetro λ , calculado mediante el análisis no compartimental de los datos ya que representan lo mismo, excepto para la formulación A en la que se obtiene un valor ligeramente más reducido en el análisis bicompartimental de los datos ($0,012 \text{ h}^{-1}$ para el

análisis bicompartimental y $0,032 \text{ h}^{-1}$ para el análisis no compartimental). Lo mismo ocurre para el V_{ss} , que es muy semejante en todas las formulaciones al V_{ss} calculado mediante el análisis no compartimental excepto para la microemulsión A (4,35 l para el análisis bicompartimental y 2,44 l para el análisis no compartimental). Esta diferencia considerable en el cálculo de determinados parámetros siguiendo un análisis no compartimental o compartimental de los datos indica el peor ajuste de esta formulación a un modelo compartimental que el resto de las formulaciones.

PARÁMETROS	FORMULACIONES			
	F	A	B	C
V_{ss} (l)	$2,035 \pm 0,17$	$4,350 \pm 3,790$	$0,630 \pm 0,100$	$1,890 \pm 0,160$
V_1 (l)	$0,716 \pm 0,09$	$0,617 \pm 0,056$	$0,291 \pm 0,010$	$0,945 \pm 0,070$
V_2 (l)	$1,319 \pm 0,11$	$3,733 \pm 0,340$	$0,339 \pm 0,080$	$0,945 \pm 0,060$
k_e (h^{-1})	$0,114 \pm 0,02$	$0,105 \pm 0,110$	$0,124 \pm 0,010$	$0,120 \pm 0,010$
K_{12} (h^{-1})	$1,037 \pm 0,35$	$0,337 \pm 0,070$	$0,172 \pm 0,030$	$0,307 \pm 0,090$
K_{21} (h^{-1})	$0,563 \pm 0,15$	$0,055 \pm 0,040$	$0,148 \pm 0,060$	$0,307 \pm 0,100$
Cl (l/h)	$0,082 \pm 0,01$	$0,065 \pm 0,060$	$0,03 \pm 0,002$	$0,113 \pm 0,006$
α (h^{-1})	$1,677 \pm 0,49$	$0,486 \pm 0,080$	$0,399 \pm 0,090$	$0,681 \pm 0,190$
β (h^{-1})	$0,038 \pm 0,007$	$0,012 \pm 0,020$	$0,046 \pm 0,010$	$0,054 \pm 0,007$
A (mg/l)	$2,371 \pm 0,46$	$3,678 \pm 0,320$	$6,088 \pm 0,690$	$1,576 \pm 0,200$
B (mg/l)	$1,117 \pm 0,10$	$0,372 \pm 0,170$	$2,474 \pm 0,770$	$1,068 \pm 0,150$

Tabla 48. Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales de las diferentes formulaciones de AmB administradas a conejos en una dosis de 1 mg/kg vía i.v. en bolus.

La constante de eliminación k_e es mayor para las formulaciones C y B ($0,120 \text{ h}^{-1}$ y $0,124 \text{ h}^{-1}$ respectivamente), y el V_{ss} es en todas las formulaciones inferior a 5 l, siendo de un valor de 0,630 l para la microemulsión B en comparación con el valor de 2,035 l para la formulación F. Para todas las formulaciones existe una diferencia significativa entre el valor de las constantes k_{12} y k_{21} , siendo la formulación F la que presenta una diferencia

mayor entre ambas constantes en comparación con el resto de las formulaciones y sobre todo con la microemulsión C que presenta un valor semejante de $0,945 \text{ h}^{-1}$ para ambas constantes.

Este comportamiento tan diferente entre las microemulsiones y la formulación F, indica una diferencia fundamental en su distribución por el organismo y una diferencia en su actividad toxicológica que se verá altamente reducida en la microemulsión C y no tanto en el resto de las microemulsiones, a diferencia de la formulación comercial F, como se verá en capítulos posteriores.

2. ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA EN BOLUS EN DOSIS UNICA: ESTUDIO DE PROPORCIONALIDAD SEGÚN LA DOSIS ADMINISTRADA

Este estudio se realizó con el fin de comprobar si dosis mayores de las nuevas formulaciones de AmB en forma de microemulsión, presentaban un comportamiento farmacocinético proporcional a la dosis administrada o si por el contrario, a mayores dosis administradas el valor de los parámetros farmacocinéticos era dosis-dependiente. Este último comportamiento dosis-independiente lo presentan las nuevas formulaciones lipídicas de AmB tales como Abelcet[®], Amphotec[®] y Ambisome[®] (Lee, J. W. et al. 1994, Wasan, K. M. et al. 1998, Groll, A. H. et al. 2000 y Fromtling, R. A. et al. 1996).

Para realizar este estudio se seleccionó la microemulsión C, que fue la que presentó un mejor comportamiento toxicológico, y su comportamiento se comparó con el comportamiento de nuevas formulaciones de AmB cuyos parámetros farmacocinéticos aparecen descritos en la literatura.

2.1. Animales de experimentación

Para realizar los estudios farmacocinéticos se emplearon como animales de experimentación, conejos machos albinos New Zealand, de un peso comprendido entre 2,5 y 3 kg. Los animales fueron alojados en jaulas independientes a una temperatura de 25°C y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, y recibieron comida y bebida sin restricciones durante todo el estudio excepto en el momento en el que se les realizó la administración del fármaco, y durante la toma de muestras sanguíneas. Los animales tuvieron un periodo de adaptación de cuatro días en el animalario previo al estudio farmacocinético.

La administración intravenosa del fármaco tipo bolus en un volumen de 2,5 ml, se realizó por la vena marginal de la oreja izquierda, y la toma de muestras en un volumen de 2 ml, se realizó por la vena marginal de la oreja derecha, con el fin de evitar posibles interferencias entre la dosis administrada y las muestras plasmáticas extraídas. Para cada dosis se emplearon 3 conejos y los análisis de muestras plasmáticas se hicieron por triplicado.

2.2. Dosis de fármaco administradas

Para la realización del estudio de proporcionalidad farmacocinético de la microemulsión C según la dosis administrada, se administraron por vía i.v. in bolus las dosis de 0,5, 1 y 2 mg/kg.

Para la preparación de la microemulsión C, cuya concentración en AmB era de 2 mg/ml, se diluyó en suero glucosado en una concentración al 5% p/v hasta obtener una solución con la concentración del fármaco adecuada a la dosis a administrar, teniendo en cuenta el peso de cada animal (2,75 kg) y el volumen de inyección (2,5 ml).

La esterilización de las muestras se hizo por filtración esterilizante mediante el uso de filtros de diámetro medio de 0,22 μm , y como queda reflejado en capítulos previos, esta esterilización no afectó al tamaño de gotícula interno de los sistemas dispersos, pero sí a la concentración de principio activo incorporado, por ello se tuvo que reajustar la dosis teniendo en cuenta la cantidad de principio activo retenido en el filtro.

2.3. Extracción y análisis de las muestras

La extracción y el análisis de las muestras plasmáticas se hizo siguiendo el protocolo descrito en el estudio farmacocinético de las formulaciones de AmB mediante la administración intravenosa tipo bolus en una dosis de 1 mg/kg. Se tomaron muestras plasmáticas heparinizadas a los 5 y 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 7 y 24 horas tras la administración i.v. del fármaco a cada una de las dosis a estudiar.

Tras finalizar el ensayo los animales fueron sacrificados mediante la administración intravenosa de 4 ml de anestesia con pentobarbital sódico por la vena lateral de la oreja izquierda.

2.4. Análisis farmacocinético

Se realizó un análisis farmacocinético compartimental y no compartimental de los datos mediante el uso del programa farmacocinético WIN NONLIN 2.1.

Para el análisis no compartimental de los datos se empleó el método log-trapezoidal con extrapolación hasta infinito recomendado por Chiou para calcular el área bajo la curva (AUC), el área bajo el momento de la curva (AUMC) y el tiempo medio de residencia (MRT) (Chiou, W. L. et al. 1978).

Para el análisis bicompartimental de los datos se empleó el algoritmo de minimización de Gauss-Newton-Levenberg-Hartley y se comprobó la precisión del ajuste farmacocinético realizado mediante el Criterio de información de Akaike (AIC) y el Criterio de Schwartz (SC).

2.5. Resultados obtenidos

A continuación en las Tablas 49 y 50 aparecen reflejados los resultados obtenidos en el estudio farmacocinético para la microemulsión C de AmB en conejos a las dosis de 0,5, y 2 mg/kg en bolus por vía endovenosa. Se realizó un análisis no compartimental de los datos y dichos resultados se compararon con los resultados de otras formulaciones de AmB descritos en la literatura.

Resultados del estudio farmacocinético de la microemulsión C tras la administración de una **dosis de 2 mg/kg** en bolus i.v. a 3 conejos.

	<u>Conejo 1</u>	<u>Conejo 2</u>	<u>Conejo 3</u>	<u>MEDIA DE LOS 3 CONEJOS</u>	
Tiempo (h)	Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Desviación estándar
0,083	13,11	11,96	13,26	12,76	0,71
0,5	6,14	6,13	5,23	5,67	0,52
1	4,49	3,37	4,16	4,03	0,57
2	2,90	2,35	2,50	2,56	0,29
3	3,08	2,48	2,25	2,49	0,43
4	2,29	1,66	1,64	1,79	0,37
7	1,57	0,93	0,99	1,09	0,35
24	0,17	0,57	0,65	0,45	0,26

Tabla 49. Resultados del estudio farmacocinético de la microemulsión C en una concentración de 2 mg/kg, tras la administración i.v. en bolus a tres conejos.

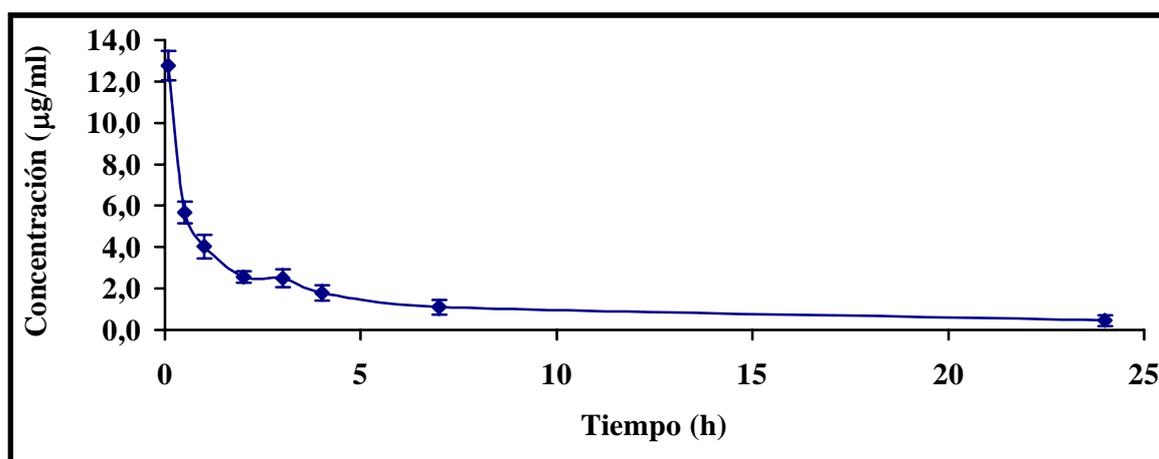


Figura 62. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión C en una dosis de 2 mg/kg.

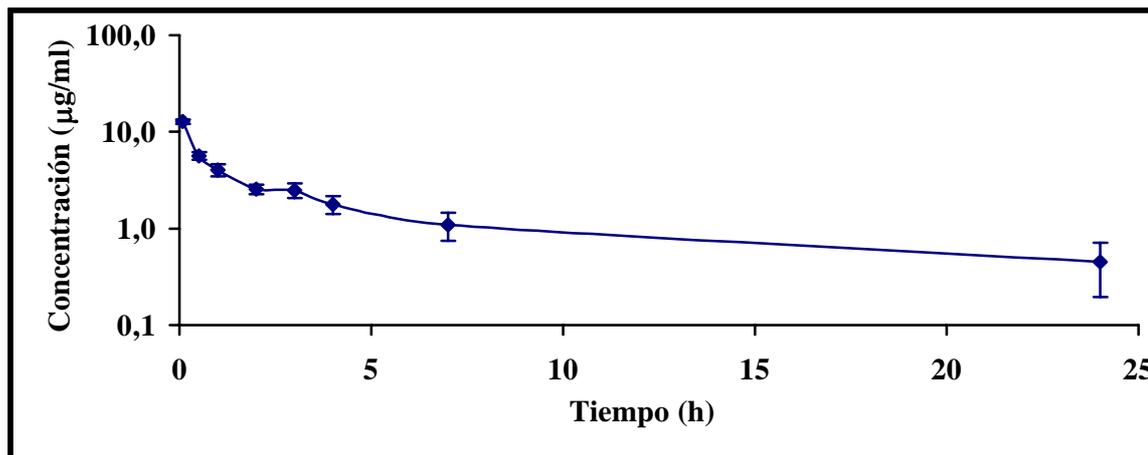


Figura 63. Representación semilogarítmica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión C en una dosis de 2 mg/kg.

Tras la administración i.v. de 2 mg/kg de la microemulsión C, se observó una cinética biexponencial con una primera fase de eliminación rápida seguida de una segunda fase de eliminación más lenta. La concentración máxima media observada fue de 12,76 µg/ml y la mínima de 0,45 µg/ml (Figura 62).

Mediante la representación semilogarítmica de los valores medios de concentraciones plasmáticas frente al tiempo se puede observar una distribución bifásica en la que los parámetros se ajustan a dos líneas rectas, cuyo punto de inflexión se produce a las cuatro horas de la administración del fármaco (Figura 63). Presenta una distribución bicompartimental, al igual que lo hacía la microemulsión C en una concentración de 1 mg/kg estudiada previamente.

Resultados del estudio farmacocinético de la microemulsión C tras la administración de una **dosis de 0,5 mg/kg** en bolus i.v. a 3 conejos.

	<u>Conejo 1</u>	<u>Conejo 2</u>	<u>Conejo 3</u>	<u>MEDIA DE LOS 3 CONEJOS</u>	
Tiempo (h)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Desviación estándar
0,083	2,63	2,01	2,55	2,38	0,34
0,5	1,51	1,42	1,27	1,39	0,12
1	0,92	1,35	1,03	1,08	0,22
2	1,28	0,58	0,90	0,87	0,35
3	0,74	0,45	1,06	0,71	0,30
4	0,74	0,67	0,45	0,61	0,16
7	0,78	0,63	0,27	0,51	0,26
24	0,17	0,27	0,16	0,19	0,06

Tabla 50. Resultados del estudio farmacocinético de la microemulsión C en una concentración de 0,5 mg/kg, tras la administración en bolus i.v. a tres conejos.

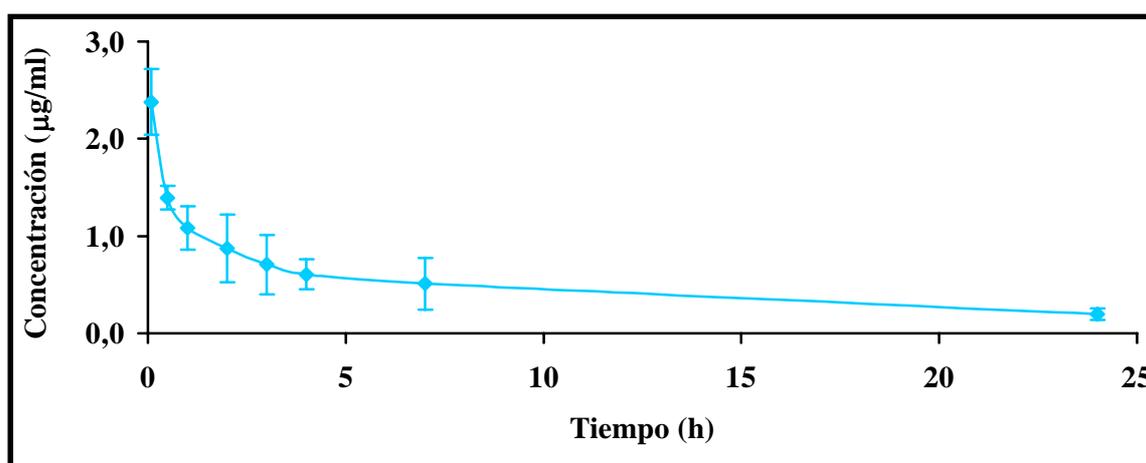


Figura 64. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión C en una dosis de 0,5 mg/kg.

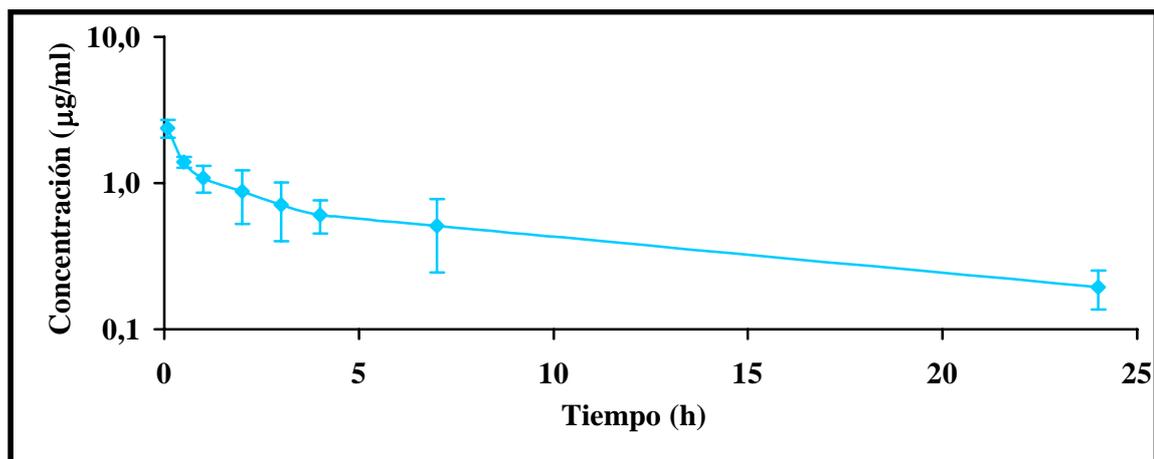


Figura 65. Representación semilogarítmica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión C en una dosis de 0,5 mg/kg.

Tras la administración i.v. de 0,5 mg/kg de la microemulsión C, se observó una cinética biexponencial con una primera fase de eliminación rápida seguida de una segunda fase de eliminación más lenta. La concentración máxima media observada fue de 2,38 $\mu\text{g/ml}$ y la mínima de 0,19 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 64).

Mediante la representación semilogarítmica de los valores medios de concentraciones plasmáticas frente al tiempo se puede observar una distribución bifásica en la que los parámetros se ajustan a dos líneas rectas, cuyo punto de corte se produce a las cuatro horas de la administración del fármaco (Figura 65). Presenta una distribución bicompartimental, al igual que lo hacía la microemulsión C en unas concentraciones de 1 y 2 mg/kg estudiadas previamente.

A continuación aparecen reflejadas en las Figuras 66 y 67 las concentraciones plasmáticas frente al tiempo de la microemulsión C tras la administración por vía i.v. en bolus en conejos de las dosis de 0,5, 1 y 2 mg/kg.

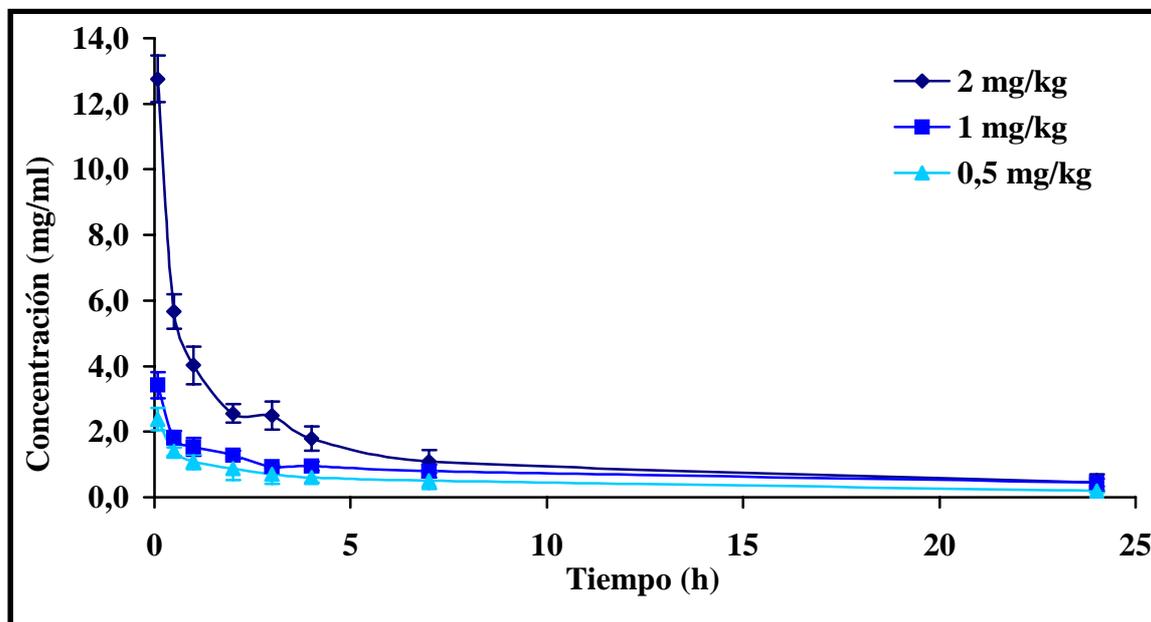


Figura 66. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de tres dosis diferentes de la microemulsión C.

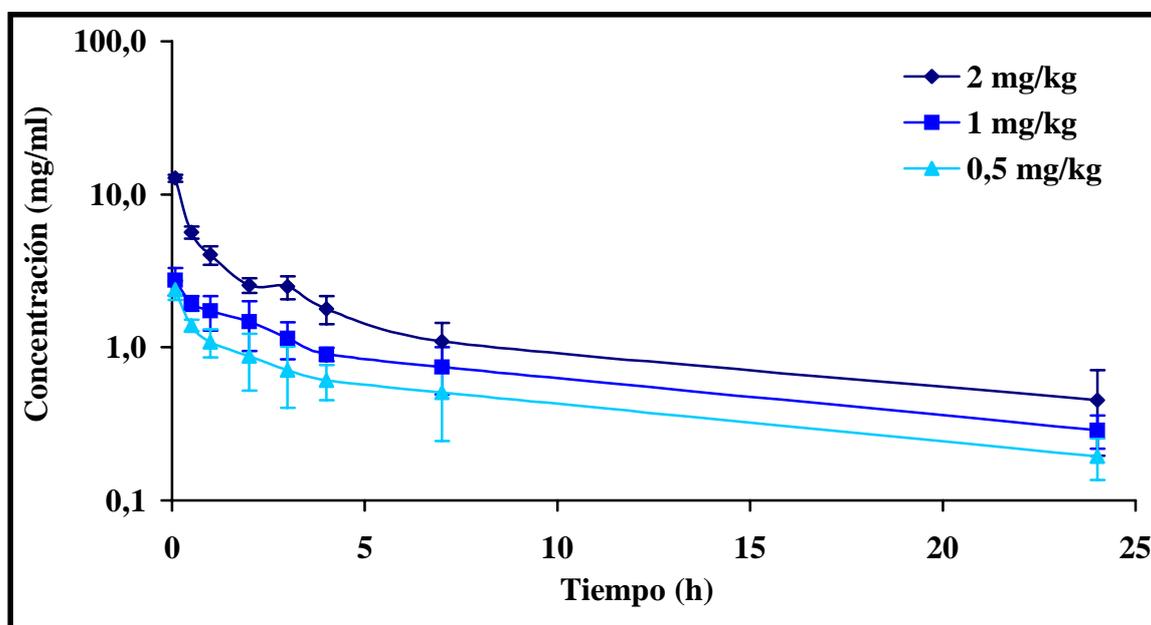


Figura 67. Representación semilogarítmica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de tres dosis diferentes de la microemulsión C.

Como se puede observar gráficamente, el valor de la C_{max} obtenida en cada una de las dosis no varía proporcionalmente. Y existe una gran proximidad para la C_{max} obtenida en las dosis de 0,5 y 1 mg/kg y una gran distancia entre la C_{max} para las dosis de 1 y 2 mg/kg. También se observa gráficamente un gran paralelismo entre las pendientes de eliminación de los perfiles farmacocinéticos de las 3 dosis estudiadas representadas en escala logarítmica.

2.6. Análisis no compartimental

Se realizó un primer estudio no compartimental de los datos mediante el método log-trapezoidal, con el fin de observar si existía una proporcionalidad entre los valores de los parámetros farmacocinéticos y la dosis administrada. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Tabla 51.

PARÁMETROS	Microemulsión C		
	0,5 mg/kg	1 mg/kg	2 mg/kg
AUC ($\mu\text{gh/ml}$)	14,457 \pm 2,702	21,89 \pm 5,170	39,359 \pm 8,896
AUMC ($\mu\text{gh}^2/\text{ml}$)	227,748 \pm 93,936	355,75 \pm 99,78	538,961 \pm 168,659
MRT (h)	15,753 \pm 5,058	16,230 \pm 0,200	13,693 \pm 6,064
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	2,6735 \pm 0,450	2,920 \pm 0,540	14,995 \pm 1,175
V_{ss} (l)	1,906 \pm 0,753	1,850 \pm 0,400	1,739 \pm 0,844
CL (l/h)	0,121 \pm 0,019	0,110 \pm 0,020	0,127 \pm 0,025
λ (h^{-1})	0,0582 \pm 0,021	0,057 \pm 0,0028	0,057 \pm 0,055
$T_{1/2}$ (h)	11,909 \pm 4,807	12,320 \pm 0,480	11,962 \pm 6,654

Tabla 51. Parámetros farmacocinéticos de la microemulsión C de AmB administrada a conejos a las dosis de 0,5, 1 y 2 mg/kg vía i.v. en bolus.

El análisis de los valores obtenidos permite observar que a mayor dosis administrada de microemulsión se produce un incremento en el AUC prácticamente proporcional para las 3 dosis estudiadas, aunque el AUC de la dosis de 0,5 mg/kg debería ser ligeramente inferior en torno a los 10 $\mu\text{gh/ml}$. También se puede observar que los valores de C_{max} para las dosis de 0,5 y 1 mg/kg son muy semejantes (2,67 y 2,92 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente) y existe una gran diferencia entre la C_{max} para la dosis de 1 y 2 mg/kg, siendo la C_{max} a la dosis de 2 mg/kg siete veces mayor.

Sin embargo el resto de los parámetros farmacocinéticos son muy semejantes para los tres tipos de dosis, lo que indica que a estas concentraciones no parece que exista una farmacocinética dosis-dependiente, ya que tanto el aclaramiento plasmático, CL, como la semivida plasmática $T_{1/2}$, y la pendiente de eliminación λ , presentan valores muy semejantes. El tiempo medio de residencia es de aproximadamente 15 h, y el volumen de distribución V_{ss} , es de aproximadamente 1,8 l.

Estos resultados obtenidos nos permiten concluir que a las dosis administradas la microemulsión C no presenta una farmacocinética dosis dependiente, lo que no indican que la administración de dosis mayores en estudios posteriores pueda presentar una farmacocinética dosis-dependiente, como ocurre con otras formulaciones lipídicas de AmB (Janknegt, R. et al. 1992) (Ver punto 2.8).

2.7. Análisis compartimental

Se realizó un análisis farmacocinético bicompartimental de los resultados obtenidos tras la administración por vía i.v. tipo bolus de la microemulsión C a las dosis de 0,5 y 2 mg/kg con el fin de realizar una comparación con los resultados obtenidos a la dosis de 1 mg/kg.

Se analizaron los parámetros AIC y SC para comprobar la precisión del ajuste a un modelo bicompartimental de los datos experimentales obtenidos. Los resultados obtenidos aparecen descritos en la Tabla 52.

Formulación	Criterio de Información de Akaike (AIC)	Criterio de Schwarz (SC)
0,5 mg/kg	-21,00	-20,69
1 mg/kg	-22,43	-19,87
2 mg/kg	-6,98	-6,67

Tabla 52. Resultados de los valores de AIC y SC para la formulación C a las dosis de 0,5, 1 y 2 mg/kg.

La dosis de 2 mg/kg es la que presenta un ajuste peor de los datos, por el contrario las dosis de 0,5 y 1 mg/kg presentan un ajuste mucho mejor ya que el valor de los parámetros AIC y SC es inferior a -20.

Este mejor ajuste se puede observar directamente en las Figuras 68 y 69. En la dosis de 2 mg/kg el valor de concentración plasmática a las 3 horas se encuentra por encima de los datos teóricos simulados, por el contrario el valor de concentración plasmática a las 7 horas se encuentra por debajo.

Sin embargo las concentraciones plasmáticas obtenidas para la dosis de 0,5 mg/kg se superponen a las concentraciones teóricas simuladas y por ello los valores de AIC y SC son menores. También se puede observar gráficamente que las desviaciones estándar de las

concentraciones plasmáticas a la dosis de 0,5 mg/kg son aparentemente mayores que para la dosis de 2 mg/kg, aunque si observamos las Tablas 49 y 50 no es así.

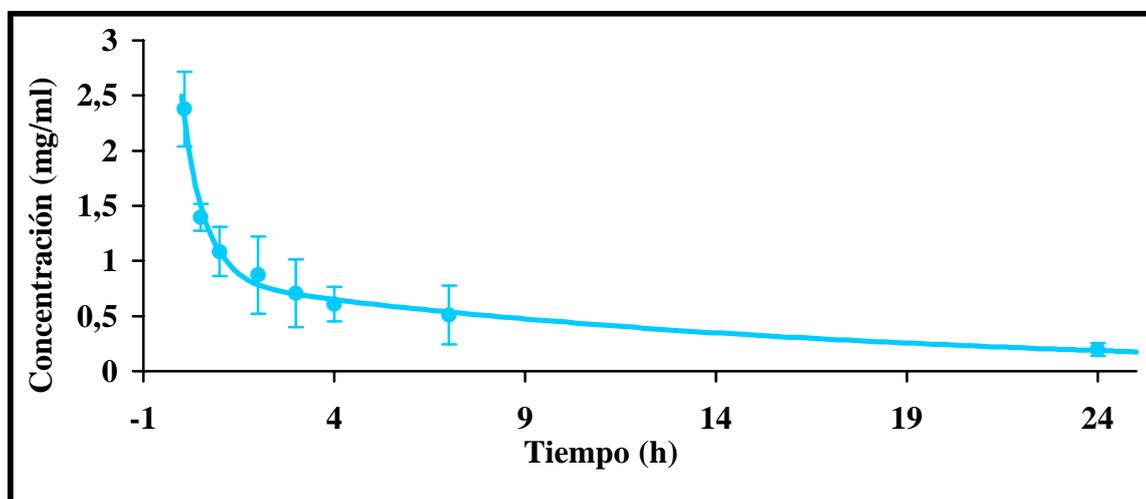


Figura 68. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión C en una dosis de 0,5 mg/kg, junto con las predicciones según un modelo bicompartimental.

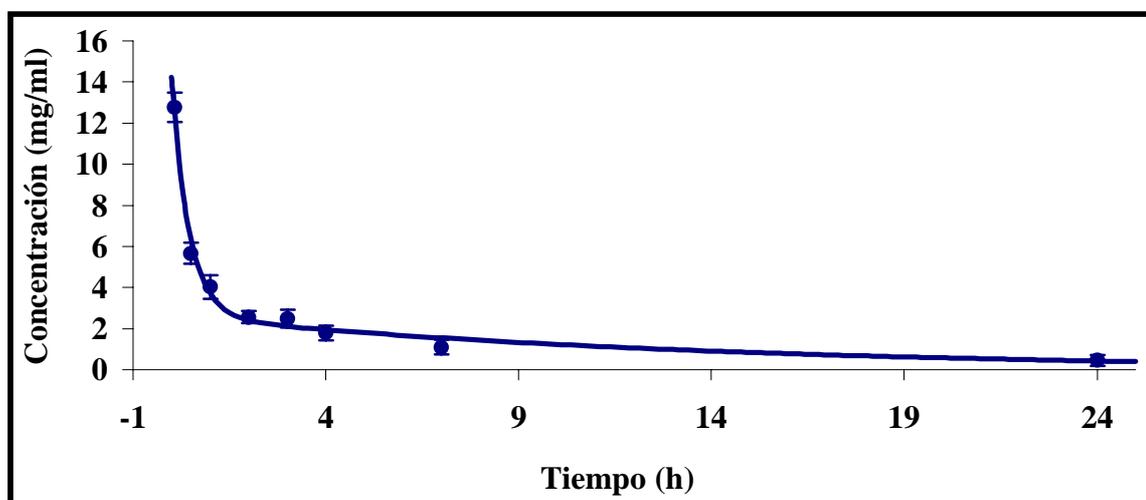


Figura 69. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración en bolus i.v. de la microemulsión C en una dosis de 2 mg/kg, junto con las predicciones según un modelo bicompartimental.

En la Tabla 53 aparecen reflejados los valores de los parámetros farmacocinéticos de un modelo bicompartimental calculados teóricamente para las tres dosis de la microemulsión C estudiadas.

Los valores obtenidos de V_{ss} son muy semejantes para las dosis de 0,5 y 1 mg/kg, sin embargo es menor para la dosis de 2 mg/kg. El aclaramiento plasmático CL presenta valores muy semejantes para las 3 dosis de 0,120 l/h, al igual que la constante β de 0,06 h⁻¹

¹, siendo ligeramente superior para la dosis de 2 mg/kg. También para la constante de eliminación K_e se obtienen valores muy semejantes para las dosis de 0,5 y 1 mg/kg ($0,150 \text{ h}^{-1}$) y sin embargo para la dosis de 2 mg/kg se obtiene un valor mucho más elevado ($0,350 \text{ h}^{-1}$).

PARÁMETROS	Microemulsión C		
	0,5 mg/kg	1 mg/kg	2 mg/kg
V_{ss} (l)	$1,837 \pm 0,090$	$1,890 \pm 0,160$	$1,431 \pm 0,162$
V_1 (l)	$0,700 \pm 0,064$	$0,945 \pm 0,070$	$0,351 \pm 0,077$
V_2 (l)	$1,130 \pm 0,082$	$0,945 \pm 0,060$	$1,080 \pm 0,120$
k_e (h^{-1})	$0,174 \pm 0,017$	$0,120 \pm 0,010$	$0,356 \pm 0,080$
K_{12} (h^{-1})	$0,989 \pm 0,238$	$0,307 \pm 0,090$	$1,427 \pm 0,512$
K_{21} (h^{-1})	$0,609 \pm 0,112$	$0,307 \pm 0,100$	$0,464 \pm 0,124$
CL (l/h)	$0,122 \pm 0,005$	$0,113 \pm 0,006$	$0,125 \pm 0,011$
α (h^{-1})	$1,711 \pm 0,342$	$0,681 \pm 0,190$	$2,172 \pm 0,648$
β (h^{-1})	$0,062 \pm 0,004$	$0,054 \pm 0,007$	$0,076 \pm 0,011$
A (mg/l)	$1,669 \pm 0,225$	$1,576 \pm 0,200$	$11,597 \pm 3,083$
B (mg/l)	$0,0829 \pm 0,050$	$1,068 \pm 0,150$	$2,635 \pm 0,359$

Tabla 53. Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales de las diferentes formulaciones de AmB administradas a conejos en una dosis de 1 mg/kg vía i.v. en bolus.

El valor de la constante A es mayor para la dosis de 0,5 mg/kg que para la dosis de 1 mg/kg, lo cual aparece reflejado en el cálculo no compartimental de la C_{max} para ambas dosis que se presenta valores muy próximos entorno a $2,7 \mu\text{g/ml}$. Este resultado indica un resultado anómalo y difícil de explicar que puede estar relacionado con un error en la medida de las concentraciones plasmáticas o en la toma de muestras, ya que a tiempos tan cortos, 5 minutos, un pequeño retraso en la toma de muestras conlleva una medida de concentración plasmática menor debido fundamentalmente a la rapidez de eliminación del fármaco en esta primera fase tras la administración i.v. Por ello las concentraciones plasmáticas obtenidas para la dosis de 1 mg/kg a los 5 minutos pueden tener un error

sistemático debido a una lenta toma de muestras y por lo tanto se obtiene concentraciones plasmáticas menores a las teóricamente existentes.

La diferencia existente en la K_e para las 3 dosis administradas de la microemulsión C pueden indicar que el fármaco presenta una cinética de eliminación saturable cuyos parámetros se verían alterados con mayor relevancia tras administraciones del fármaco a dosis mayores. Pero a las dosis de 0,5 l y 2 mg/kg se obtiene valores semejantes del parámetro β , y del CL, y por lo tanto se podría concluir que a estas dosis la posible eliminación saturable del fármaco no se ve reflejada con claridad tras el análisis de los parámetros farmacocinéticos calculados para un modelo bicompartimental tras la administración intravenosa del fármaco en bolus.

2.8. Otros estudios realizados en conejos de proporcionalidad según la dosis administrada de nuevas formulaciones de AmB.

En la literatura se encuentran pocos estudios farmacocinéticos de AmB realizados en conejos (Kwong, E. H. et al. 2001, Clemons, K. V: et al. 2001, Ramaswamy, M. et al. 2001). Generalmente los estudios farmacocinéticos realizados emplean como animales de laboratorio en su mayoría ratas y ratones.

A continuación en la Tabla 54, aparecen descritos los parámetros farmacocinéticos obtenidos en los estudios farmacocinéticos realizados en conejos por diversos autores, en los últimos 8 años.

El análisis de los resultados obtenidos permite observar la gran variabilidad existente entre los datos obtenidos por diferentes autores empleando las mismas formulaciones de AmB a las mismas dosis. Por ejemplo si se observa el AUC para la Fungizona[®] en una dosis de 1 mg/kg para 3 autores diferentes, se pueden observar grandes diferencias que varían de 11,30 mgh/l a 35 mgh/l. También existen diferencias en los valores obtenidos para el V_{ss} siendo para la Fungizona[®] en una dosis de 1 mg/kg de 0,77 l/kg, muy semejante al valor obtenido en esta memoria (0,84 l/kg).

También se puede observar que a iguales dosis de formulación administrada, es el Ambisome[®] aquella formulación que presenta valores más elevados de C_{max} y AUC, y sin embargo Abelcet[®] y Amphotec[®] presentan valores menores que la Fungizona[®]. La microemulsión C presenta unos parámetros farmacocinéticos cuyos valores se encuentran próximos a los de la Fungizona[®], pero son significativamente menores; por lo tanto su comportamiento parece ser semejante al de las formulaciones de Abelcet[®] y Amphotec[®]. Al presentar el Ambisome[®] una eliminación saturable, los autores omiten los valores de V_{ss} y CL, ya que en cinéticas saturables carecen de valor real.

En los estudios realizados de proporcionalidad según la dosis administrada tanto para la formulación comercial Fungizona[®], como para la formulación liposomal Ambisome[®] se observa que, a mayores concentraciones de AmB, los parámetros de C_{max} y AUC no se ven incrementados proporcionalmente y por lo tanto este incremento de los parámetros no proporcional indica una posible eliminación saturable del fármaco, al igual que le sucede a la microemulsión C.

FORMULACIÓN	Dosis (mg/kg)	C _{max} (mg/l)	AUC (mgh/l)	V _{ss} (l/kg)	CL (l/h)
^a Fungizona [®]	0,5	2,30 ± 0,40	18 ± 3,00	0,45 ± 0,01	0,087 ± 0,020
	1	4,70 ± 0,17	31 ± 2,20	0,77 ± 0,02	0,088 ± 0,007
	1,5	4,80 ± 0,70	35 ± 1,70	0,87 ± 0,05	0,144 ± 0,018
^c Fungizona [®]	1	3,87 ± 0,08	14,44 ± 0,36	-	-
^b Fungizona [®]	1	-	11,30 ± 2,50	1,25 ± 0,187	0,088 ± 0,019
^a Ambisome ^{®*}	0,5	11 ± 2,2	20 ± 8,4	-	-
	1	26 ± 2,4	60 ± 16	-	-
	2,5	53 ± 3,0	207 ± 18	-	-
	5	132 ± 4,4	838 ± 96	-	-
	10	287 ± 14	2223 ± 246	-	-
^c Ambisome [®]	5	62,02 ± 1,32	1141 ± 33	-	-
^d Abelcet [®]	10	2,7	34	15	0,274
^c Abelcet [®]	5	0,99 ± 0,09	10,03 ± 1,01	-	-
^b Abelcet [®]	1	-	2,1 ± 0,3	5,54 ± 0,70	0,47 ± 0,058
^c Amphotec [®]	5	1,79 ± 0,12	11,21 ± 1,06	-	-
^e Fungizona [®]	1	3,89 ± 0,48	32,28 ± 7,31	0,84 ± 0,08	0,08 ± 0,02
^e Microemul- sión C	1	2,92 ± 0,54	21,89 ± 5,17	0,74 ± 0,16	0,11 ± 0,02

* Eliminación saturable, ^a Lee, J. W. et al. 1994, ^b Wasan, K. M. et al. 1998, ^c Groll, A. H. et al. 2000, ^d Fromtling, R. A. 1996, ^e Datos obtenidos en esta Tesis doctoral

Tabla 54. Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración de diferentes dosis de nuevas formulaciones de AmB en conejos.

3. ADMINISTRACIÓN POR PERFUSIÓN INTRAVENOSA EN DOSIS MÚLTIPLE

Este estudio se realizó con el fin de observar el comportamiento de las formulaciones de AmB en el organismo al ser administradas según se emplean a nivel hospitalario para el tratamiento de micosis sistémicas en pacientes inmunodeprimidos. Por ello se administraron dosis de 1 mg/kg de la microemulsión C y la formulación F a conejos por perfusión intravenosa durante un periodo de 4 días.

3.1. Animales de experimentación

Para realizar los estudios farmacocinéticos se emplearon como animales de experimentación, conejos machos albinos New Zealand, de un peso comprendido entre 2,5 y 3 kg. Los animales fueron alojados en jaulas independientes a una temperatura de 25°C y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, y recibieron comida y bebida sin restricciones durante todo el estudio excepto en el momento en el que se les realizó la administración del fármaco, y durante la toma de muestras sanguíneas. Los animales tuvieron un periodo de adaptación de cuatro días en el animalario previo al estudio farmacocinético.

La administración por perfusión intravenosa del fármaco en un volumen de 30 ml durante 30 minutos, se realizó por la vena marginal de la oreja izquierda, y la toma de muestras en un volumen de 2 ml, se realizó por la vena lateral de la oreja derecha. Para cada tipo de formulación se emplearon 3 conejos y los análisis de muestras plasmáticas se hicieron por triplicado.

3.2. Dosis de fármaco administradas

Para la realización del estudio farmacocinético comparativo de la administración por perfusión i.v. de las formulaciones de AmB frente a la formulación F, se seleccionó la microemulsión C por ser la que presentaba mejores características toxicológicas como se verá posteriormente. Se emplearon dosis de 1 mg/kg para ambas formulaciones.

Para la preparación de la microemulsión cuya concentración en AmB era de 2 mg/ml, se diluyó en suero glucosado en una concentración al 5% p/v hasta obtener una solución con la concentración del fármaco de 1mg/kg, teniendo en cuenta el peso de cada animal (2,75 kg) y el volumen final a perfundir de 30 ml.

La esterilización de las muestras se hizo por filtración esterilizante mediante el uso de filtros de diámetro medio de 0,22 μ m, como ya queda reflejado en capítulos previos. En el caso de la formulación F, la dosis a administrar se preparó según las instrucciones del fabricante, usando agua estéril para la resuspensión seguida de una posterior dilución en suero glucosado fisiológico al 5% p/v, hasta obtener la concentración de fármaco adecuada a las dosis a administrar que fue de 1 mg/kg teniendo en cuenta que el volumen final a perfundir fue de 30 ml.

La administración por perfusión intravenosa se realizó mediante el empleo de un equipo estéril para infusión intravenosa por gravedad denominado Perfusend[®] (Sendal), conectado por un extremo a un recipiente estéril en cuyo interior se introdujo la formulación para ser administrada, y por el otro a un dispositivo estéril de perfusión intravenosa Butterfly[®]-19 (VenisystemsTM) con una aguja de 22,2 mm de longitud y un diámetro de 0,8 mm (Figura 70).

Con el fin de favorecer la perfusión del fármaco, sin necesidad del uso de una bomba peristáltica, se colocó el recipiente que contenía la formulación en una posición más elevada que el conejo al cual se le iba a administrar el fármaco en estudio, y se lavó la aguja del dispositivo estéril de perfusión intravenosa Butterfly®-19 con heparina, para evitar posibles coágulos derivados de la inyección prolongada en la oreja del animal.

Una vez introducida la aguja del dispositivo estéril de perfusión intravenosa Butterfly®-19 en la oreja del conejo, se tapó con vendas y esparadrapo el lugar de la inyección, hasta finalizar la perfusión intravenosa (30 minutos).

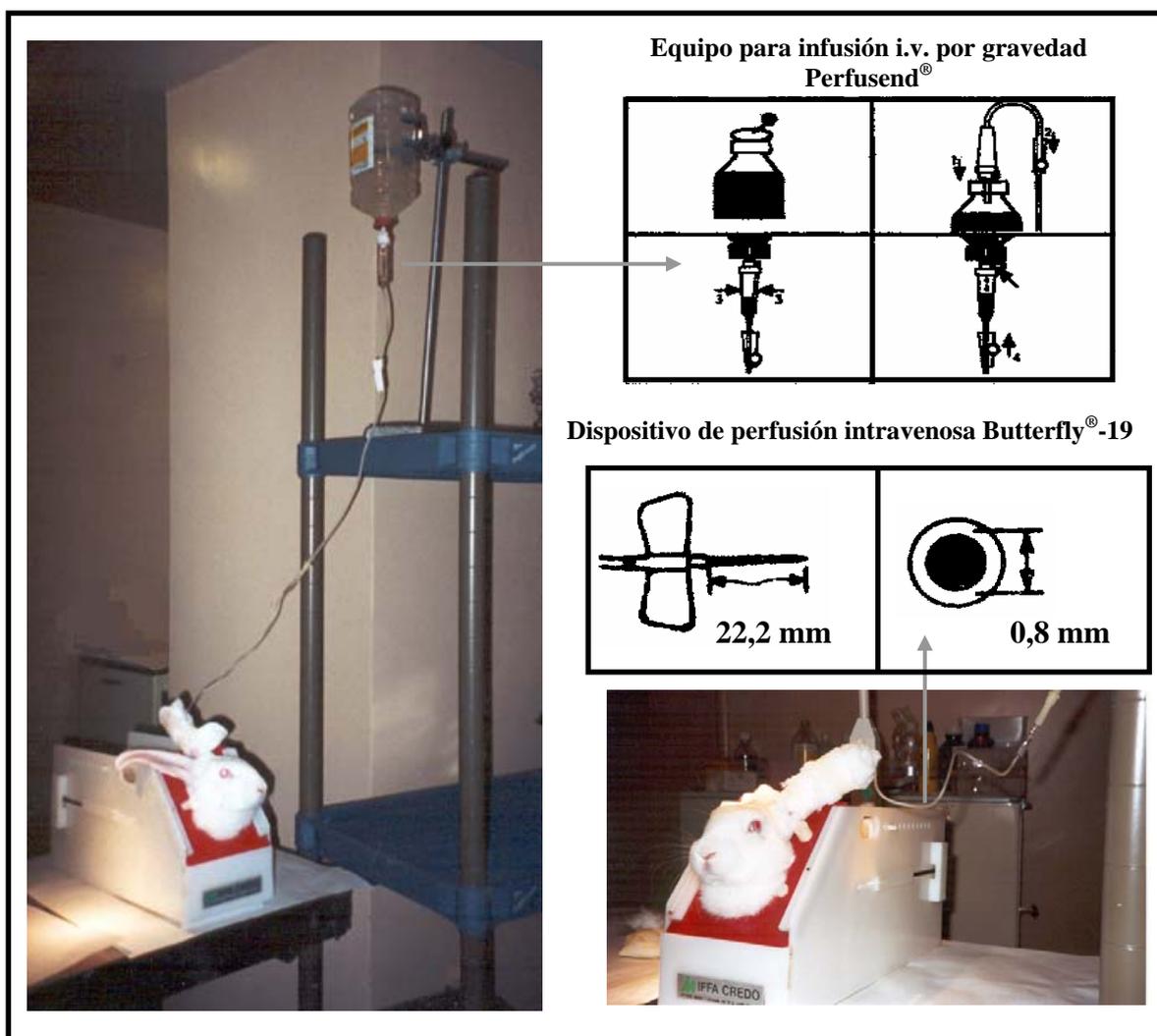


Figura 70. Fotografías del sistema de perfusión empleado para la administración de las formulaciones F y C de AmB en una dosis de 1 mg/kg durante 4 días.

3.3. Extracción y análisis de las muestras

La extracción y el análisis de las muestras plasmáticas se hizo siguiendo el protocolo descrito en el estudio farmacocinético de las formulaciones de AmB mediante la administración intravenosa tipo bolus, variando únicamente el tiempo de toma de muestras que se realizó a los 15 minutos durante la perfusión, a los 30 minutos una vez finalizada la perfusión, a las 4 horas y a las 24 horas, justo antes de comenzar la siguiente infusión del fármaco, excepto el día cuarto en el que se tomaron muestras a las 2, 4, 7 y 24 horas, con el fin de observar como se producía la eliminación del fármaco del organismo. Se seleccionó la toma de muestras a las 4 horas ya que a este tiempo se producía el corte de la distribución bifásica caracterizada para estas formulaciones en el apartado anterior.

Tras finalizar el ensayo los animales fueron sacrificados mediante la administración intravenosa de 4 ml con pentobarbital sódico por la vena lateral de la oreja izquierda.

3.4. Análisis farmacocinético

Se realizó un análisis farmacocinético compartimental de los datos mediante el uso del programa farmacocinético WIN NONLIN 2.1. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo farmacocinético de perfusión intravenosa siguiendo un modelo bicompartimental, tal y como se había estudiado previamente.

3.5. Resultados obtenidos

En este estudio con un fin orientativo, ya que es un ensayo piloto, se intentó que las condiciones de administración del fármaco se asemejasen lo más posible a las condiciones reales de uso a nivel hospitalario. Uno de los problemas encontrados a la hora de administrar el fármaco fue el de la limitación del número de tomas de muestras plasmáticas, debido a la alteración de la oreja del conejo por sucesivas punciones para obtener dichas muestras. Por ello el tratamiento se redujo a cuatro días. Esta limitación del número de muestras plasmáticas analizadas dio lugar a un análisis farmacocinético poco preciso y sesgado de los datos obtenidos ya que el número de muestras plasmáticas analizadas tan solo pudo ser de 4 (a los 15 y 30 minutos, y a las 4 y 24 horas) para los 3 primeros días y de 6 para el último día (a los 15 y 30 minutos, y a las 2, 4, 7 y 24 horas). Este problema se intentó solucionar evitando el elevado número de punciones sucesivas mediante la introducción de una vía en la vena lateral de la oreja del conejo, pero era necesario inmovilizar la oreja del animal, lo cual no fue posible. A continuación aparecen reflejados los resultados obtenidos en el estudio farmacocinético para las formulaciones de AmB en conejos a una dosis de 1 mg/kg por perfusión intravenosa durante 4 días.

Resultados de la administración por infusión i.v. de la microemulsión C a 3 conejos en una dosis de 1 mg/kg durante 4 días.

	<u>Conejo 1</u>	<u>Conejo 2</u>	<u>Conejo 3</u>	<u>MEDIA DE LOS 3</u> <u>CONEJOS</u>	
Tiempo (h)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Desviación estándar
0,25	1,09	2,38	1,96	1,72	0,65
0,5	1,97	1,80	2,11	1,96	0,16
4	0,79	0,89	1,00	0,89	0,10
24	0,28	0,48	0,29	0,34	0,11
24,5	3,37	1,61	3,17	2,58	0,96
28	1,03	0,92	1,02	0,99	0,06
48	0,54	0,27	0,46	0,41	0,14
48,5	3,29	1,97	2,94	2,67	0,68
52	1,02	0,91	1,75	1,17	0,46
72	0,33	0,21	0,44	0,31	0,11
72,5	2,58	2,25	3,45	2,72	0,62
74	1,45	1,43	1,10	1,31	0,20
76	1,13	1,11	1,53	1,24	0,24
79	0,75	1,31	1,26	1,07	0,31
96	0,32	0,28	0,46	0,34	0,10

Tabla 55. Resultados del estudio farmacocinético de la microemulsión C en una concentración de 1 mg/kg, tras la administración por perfusión i.v. a tres conejos durante 4 días.

Tras la administración por perfusión i.v. de 1 mg/kg de la microemulsión C, se observó una cinética biexponencial después de cada una de las administraciones del fármaco con una primera fase de eliminación rápida seguida de una segunda fase de eliminación más lenta (Figura 71). Esta caracterización de la eliminación del fármaco es sesgada debido al reducido número de muestras plasmáticas obtenidas, y se aprecia mejor en la cuarta infusión donde el número de muestras plasmáticas es mayor. La concentración máxima media observada fue de 2,72 µg/ml a las 72,5 horas y la mínima de 0,31 µg/ml a las 72 horas.

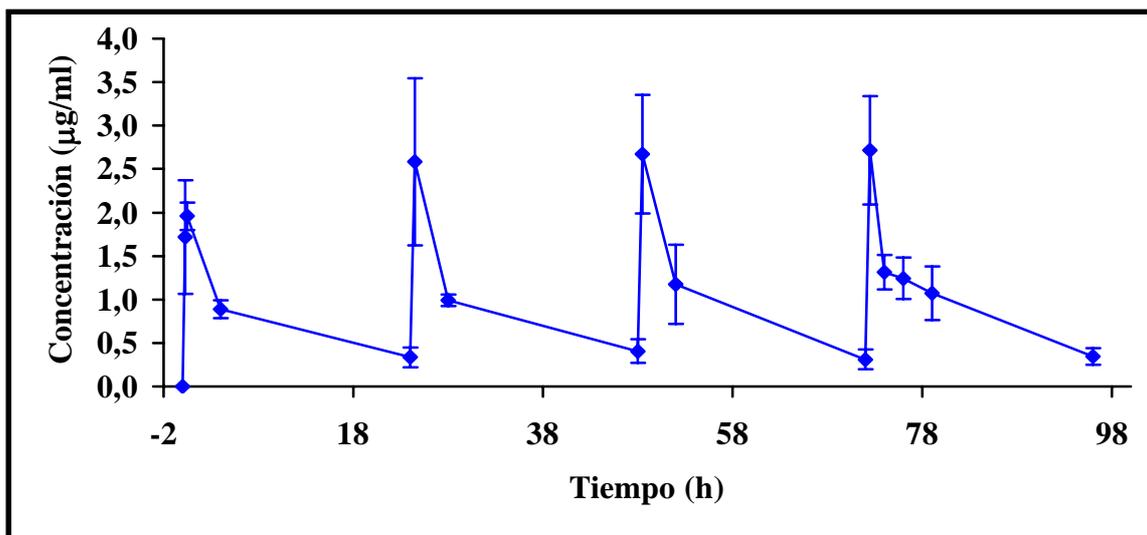


Figura 71. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración por perfusión i.v. de la microemulsión C en una dosis de 1 mg/kg durante 4 días.

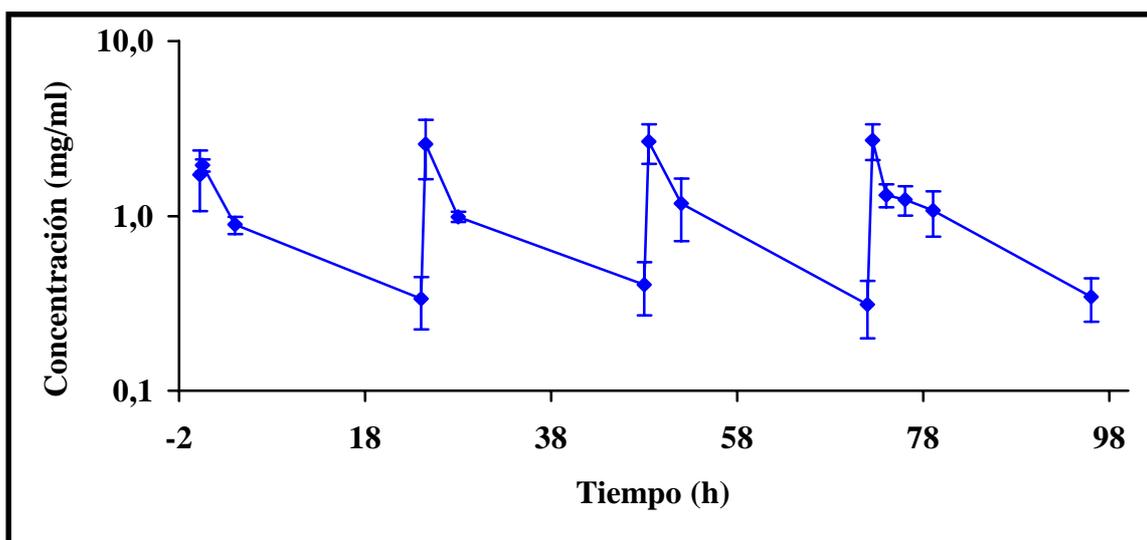


Figura 72. Representación semilogarítmica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración por perfusión i.v. de la microemulsión C en una dosis de 1 mg/kg durante 4 días.

Mediante la representación semilogarítmica de los valores medios de concentraciones plasmáticas frente al tiempo (Figura 72) se puede observar una distribución bifásica en la que los parámetros se ajustan a dos líneas rectas, la primera, más corta y de pendiente más acentuada, y la segunda recta más larga y de menor pendiente.

Se puede observar el progresivo aumento de las concentraciones plasmáticas obtenidas tras la finalización de la administración de la dosis de fármaco, a los 30 minutos, y a las 24,5, 48,5, y 72,5 horas.

Resultados de la administración por perfusión i.v. de la formulación F a 3 conejos con una dosis de 1 mg/kg durante 4 días.

	<u>Conejo 1</u>	<u>Conejo 2</u>	<u>Conejo 3</u>	<u>MEDIA DE LOS 3</u> <u>CONEJOS</u>	
Tiempo (h)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Conc (µg/ml)	Desviación estándar
0,25	1,40	2,25	-	1,77	0,60
0,5	1,71	1,80	2,44	1,96	0,40
4	1,22	1,01	1,08	1,10	0,10
24	0,33	0,50	0,37	0,39	0,09
24,5	1,98	2,02	2,41	2,13	0,24
28	0,78	1,08	1,01	0,95	0,16
48	0,20	0,52	0,53	0,38	0,19
48,5	1,81	2,37	2,57	2,22	0,40
52	0,77	1,14	1,22	1,02	0,24
72	0,21	0,46	0,50	0,37	0,16
72,5	1,78	2,63	2,47	2,26	0,45
74	1,40	1,22	1,61	1,40	0,19
76	1,10	1,01	1,19	1,10	0,09
79	0,93	1,09	0,67	0,88	0,21
96	-	0,54	0,24	0,36	0,21

Tabla 56. Resultados del estudio farmacocinético de la formulación F en una concentración de 1 mg/kg, tras la administración por perfusión i.v. a tres conejos durante 4 días.

Tras la administración por perfusión i.v. de 1 mg/kg de la formulación F, se observó una cinética biexponencial después de cada una de las administraciones del fármaco con una primera fase de eliminación rápida seguida de una segunda fase de eliminación más lenta (Figura 73). La concentración máxima media observada fue de 2,26 µg/ml a las 72,5 horas y la mínima de 0,36 µg/ml a las 96 horas.

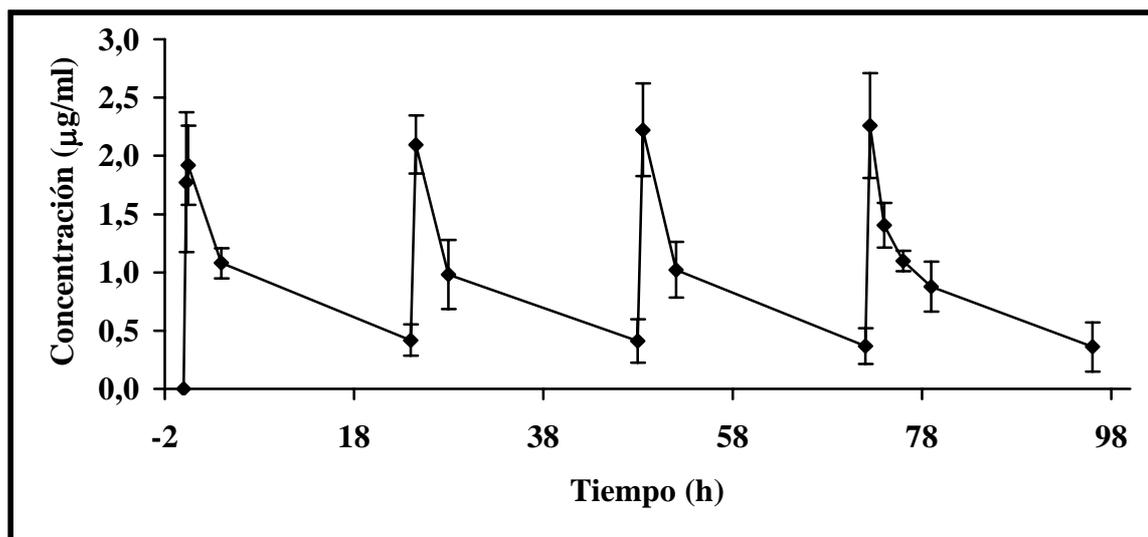


Figura 73. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración por perfusión i.v. de la formulación F en una dosis de 1 mg/kg durante 4 días.

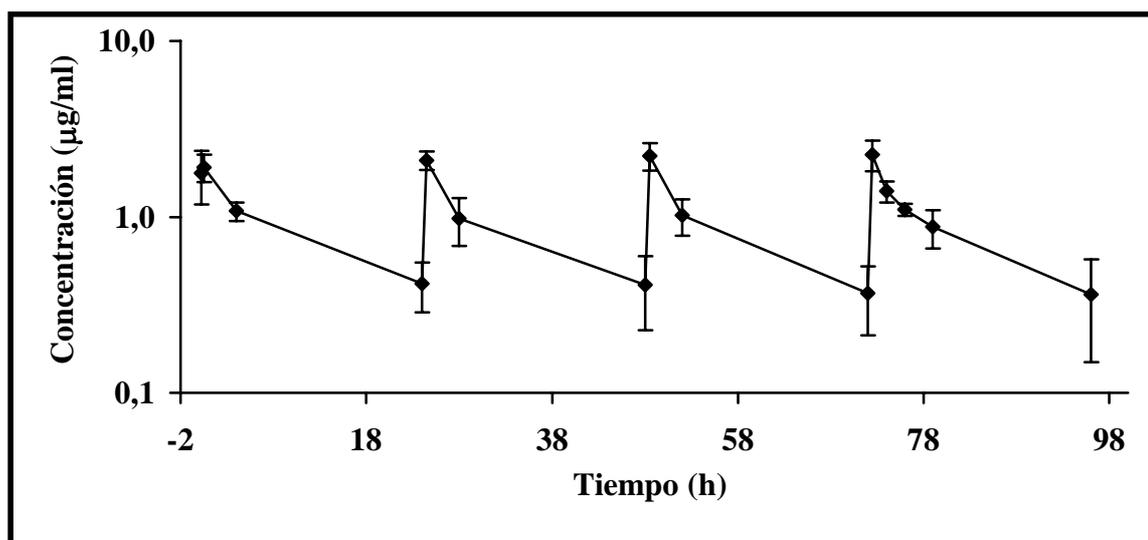


Figura 74. Representación en escala semilogarítmica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración por perfusión i.v. de la formulación F en una dosis de 1 mg/kg durante 4 días.

Mediante la representación semilogarítmica de los valores medios de concentraciones plasmáticas frente al tiempo (Figura 74) se puede observar una distribución bimodal en la que los parámetros se ajustan a dos líneas rectas, la primera, más corta y de pendiente más acentuada, y la segunda recta más larga y de menor pendiente.

A continuación se representa en las Figuras 75 y 76 los valores medios de las concentraciones plasmáticas obtenidos para las dos formulaciones estudiadas, en escala normal y logarítmica.

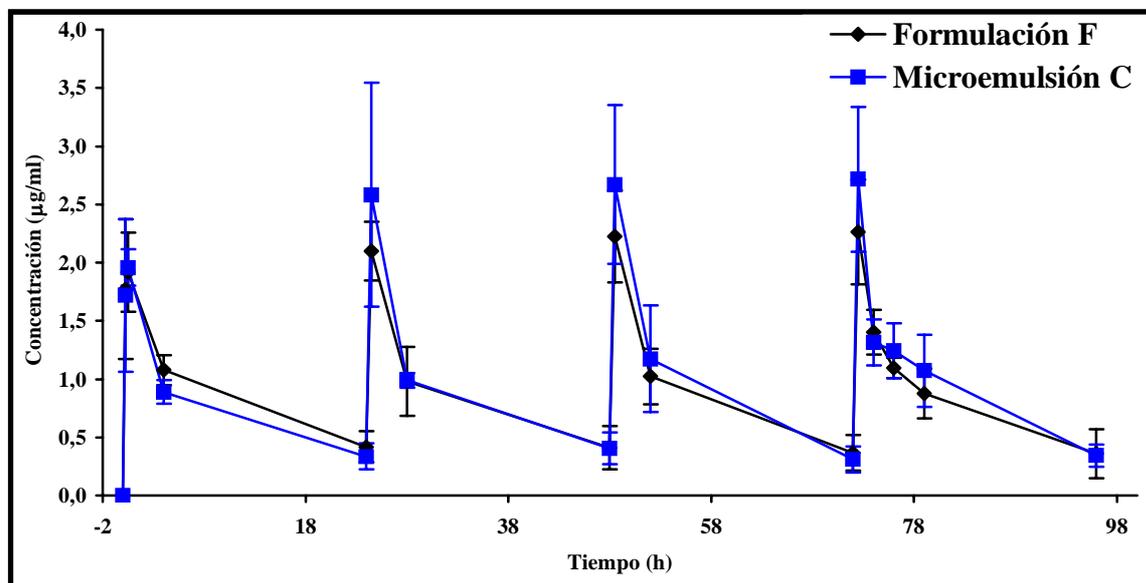


Figura 75. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración por perfusión i.v. de las formulaciones F y C en una dosis de 1 mg/kg durante 4 días.

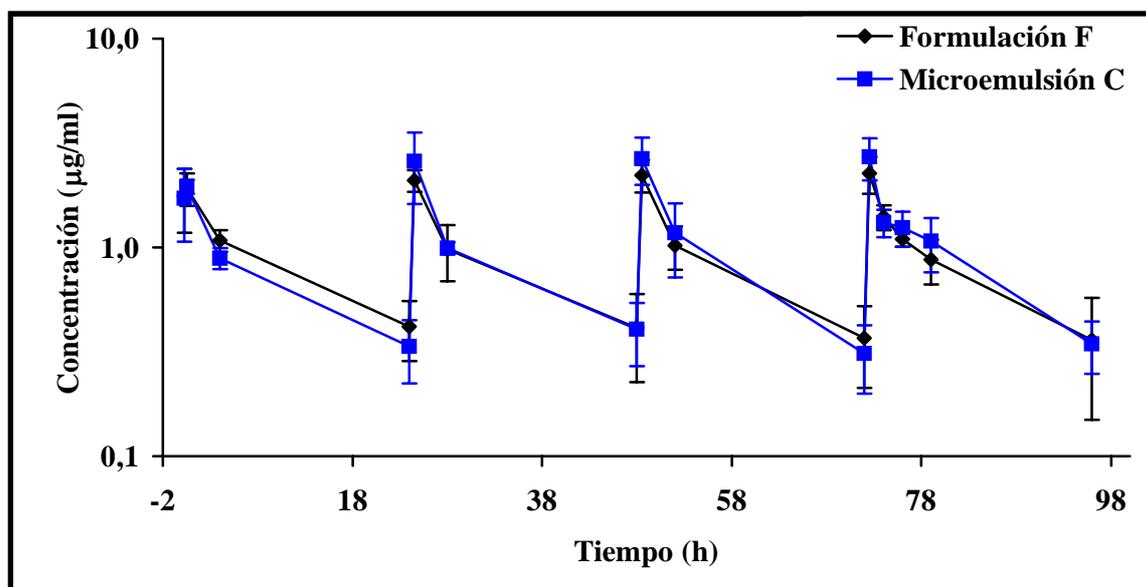


Figura 76. Representación en escala semilogarítmica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración por perfusión i.v. de las formulaciones F y C en una dosis de 1 mg/kg durante 4 días.

Al ser un estudio débil, debido al escaso número de datos que se poseen, es difícil realizar una comparación precisa de los resultados obtenidos para ambas formulaciones. Se puede observar un comportamiento muy semejante para ambas formulaciones alcanzándose concentraciones plasmáticas mayores para la microemulsión C. Respecto a la pendiente de eliminación que presentan las formulaciones, se puede observar gráficamente (Figura 76) una pendiente de eliminación de la fase terminal más pronunciada para la formulación C.

3.6. Análisis compartimental

Se realizó un análisis compartimental de los datos obtenidos con el fin de caracterizar el comportamiento de las formulaciones estudiadas en organismos vivos, y tratar de observar diferencias entre ambas formulaciones que permitieran discernir el diferente mecanismo de acción de la microemulsión C respecto a la formulación comercial F, que hace que esta nueva formulación C en forma de microemulsión sea menos tóxica e igualmente eficaz que la formulación F como se verá en capítulos posteriores de esta memoria.

A continuación aparecen representados en las Figuras 77 y 78 los valores teóricos simulados del ajuste compartimental junto con los niveles plasmáticos medios y las desviaciones estándar de ambas formulaciones.

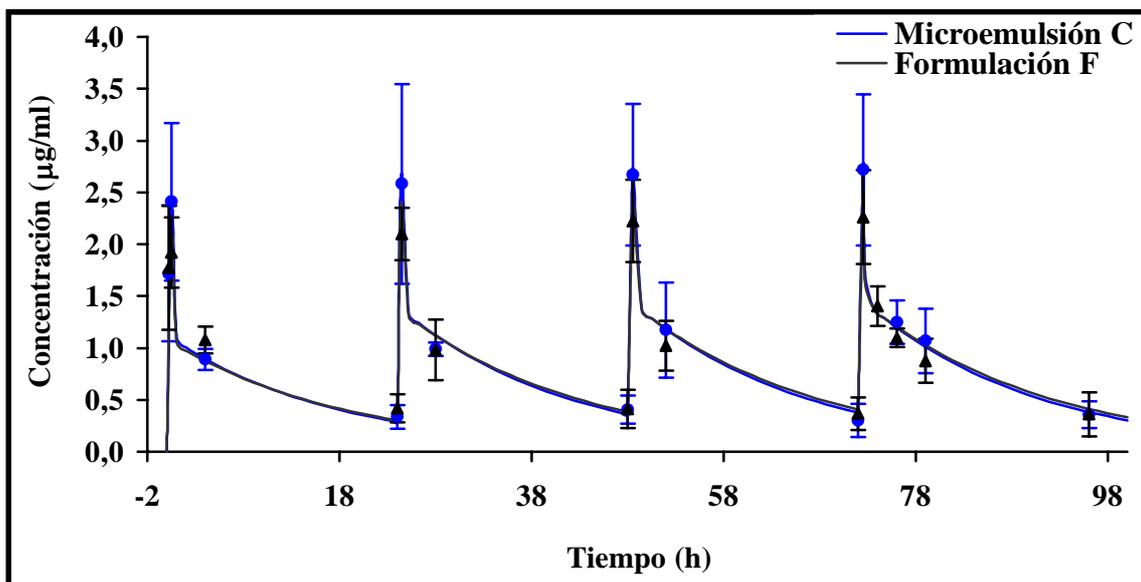


Figura 77. Representación gráfica de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración por perfusión i.v. de las formulaciones F y C durante 4 días junto con las predicciones según un modelo bicompartimental.

Se empleó como modelo farmacocinético un modelo bicompartimental de distribución del fármaco. Gráficamente se observa que el ajuste teórico compartimental de las ambas formulaciones es muy semejante, siendo la microemulsión C la que presenta una pendiente de eliminación ligeramente mayor.

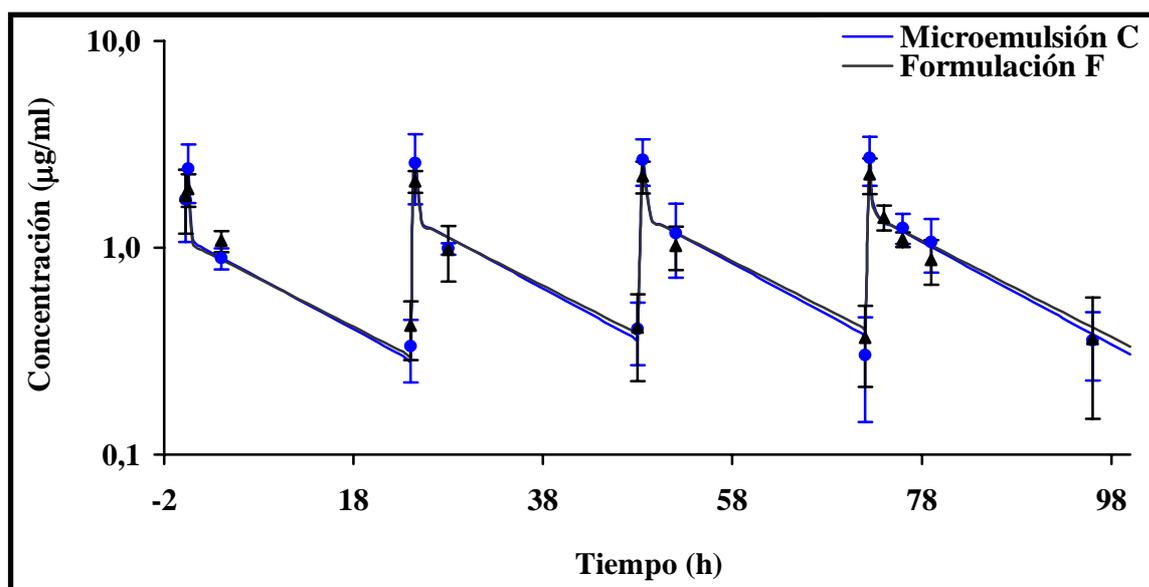


Figura 78. Representación en escala semilogarítmica de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración por perfusión i.v. de las formulaciones F y C durante 4 días y de las predicciones según un modelo bicompartmental.

A continuación en la Tabla 57 aparecen reflejados los parámetros farmacocinéticos calculados para ambas formulaciones.

Formulaciones			Formulaciones		
Parámetros	F	C	Parámetros	F	C
V_{ss} (l)	$3,09 \pm 0,36$	$2,94 \pm 0,20$	AUC ($\mu\text{gh}/\text{ml}$)	$20,54 \pm 1,18$	$20,12 \pm 0,66$
V_1 (l)	$0,69 \pm 0,67$	$0,61 \pm 0,29$	AUMC ($\mu\text{gh}^2/\text{ml}$)	$378,7 \pm 0,21$	$346,30 \pm 23,90$
V_2 (l)	$2,40 \pm 0,98$	$2,33 \pm 0,47$	MRT (h)	$18,18 \pm 2,04$	$16,95 \pm 1,03$
k_e (h^{-1})	$0,246 \pm 0,24$	$0,28 \pm 0,13$	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$2,10 \pm 0,22$	$2,38 \pm 0,14$
K_{12} (h^{-1})	$5,60 \pm 9,95$	$5,27 \pm 4,63$	CL (l/h)	$0,17 \pm 0,009$	$0,17 \pm 0,005$
K_{21} (h^{-1})	$1,60 \pm 0,93$	$1,38 \pm 0,40$	A (mg/l)	$3,99 \pm 4,91$	$4,58 \pm 2,76$
α (h^{-1})	$7,40 \pm 11,05$	$6,88 \pm 5,14$	B (mg/l)	$1,07 \pm 0,13$	$1,10 \pm 0,08$
β (h^{-1})	$0,05 \pm 0,006$	$0,05 \pm 0,003$			

Tabla 57. Parámetros farmacocinéticos bicompartmentales de las formulaciones C y F de AmB administradas a conejos en una dosis de 1 mg/kg por perfusión i.v. durante 4 días.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos presentan unos valores muy semejantes para ambas formulaciones, aunque en general para todos los parámetros, la microemulsión C presenta valores ligeramente menores. En comparación con los parámetros farmacocinéticos obtenidos por administración intravenosa tipo bolus, la microemulsión C es la que presenta valores más parecidos en los parámetros calculados. Por ejemplo el valor de la pendiente β en la administración en bolus i.v. y en la perfusión i.v. presenta un valor semejante de $0,054 \text{ h}^{-1}$. Lo mismo sucede con el MRT de $16,23 \text{ h}$ y el AUC de $21,89 \mu\text{gh/ml}$.

La diferencia fundamental entre los dos tipos de administración se encuentra en el valor de la C_{max} inicial y aparece reflejado en las Figuras 79 y 80.

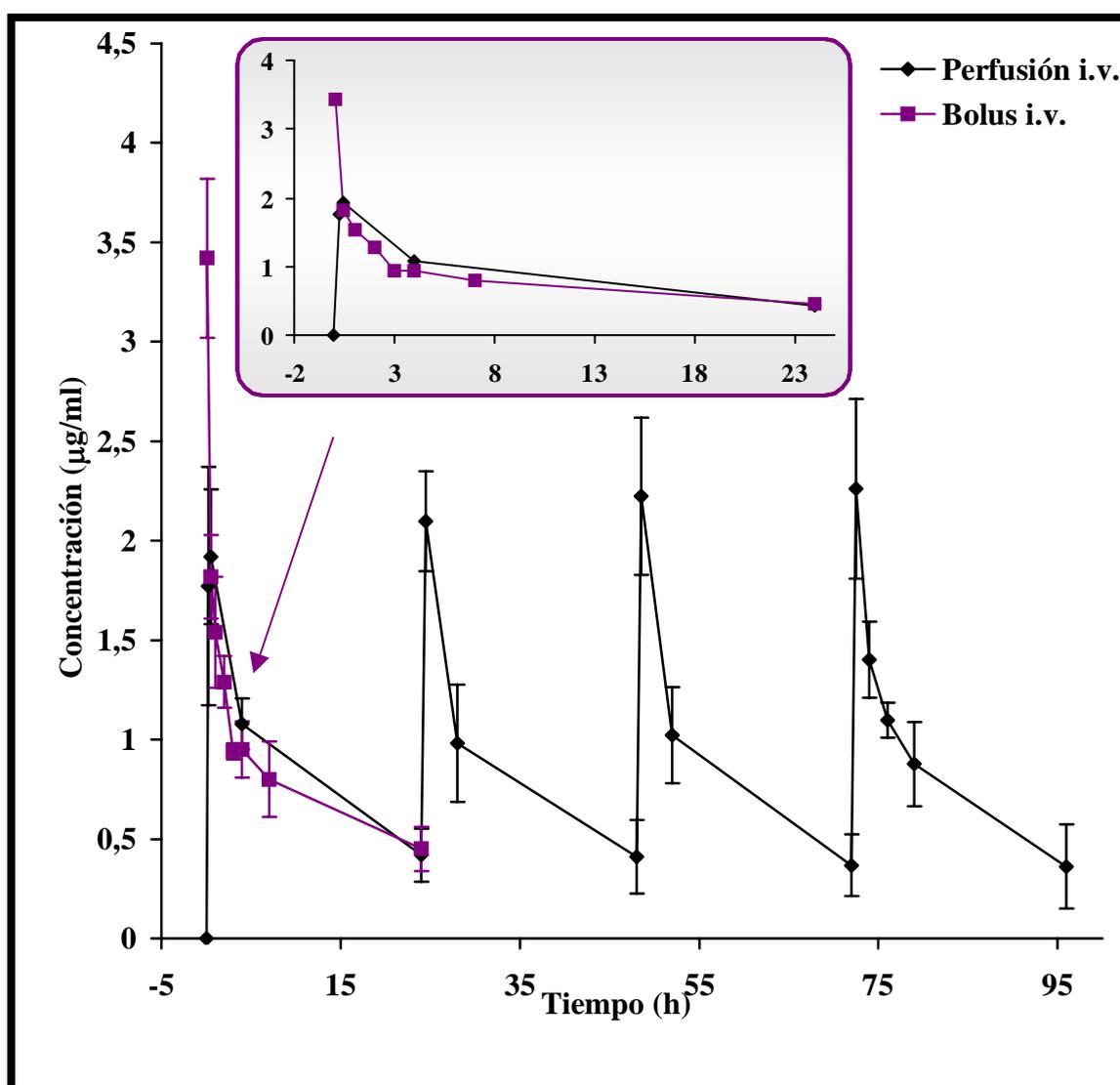


Figura 79. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración por perfusión i.v. de la formulación F en una dosis de 1 mg/kg durante 4 días, junto con la administración en bolus i.v. de la misma formulación y a la misma dosis.

En las Figuras 79 y 80 están representados conjuntamente los dos tipos de administraciones con el fin de ver más claramente las diferencias existentes. Debido al escaso número de datos obtenidos para la administración por perfusión intravenosa, es difícil observar con claridad diferencias significativas, pero con los datos existentes se observa una semejanza de comportamiento muy elevada.

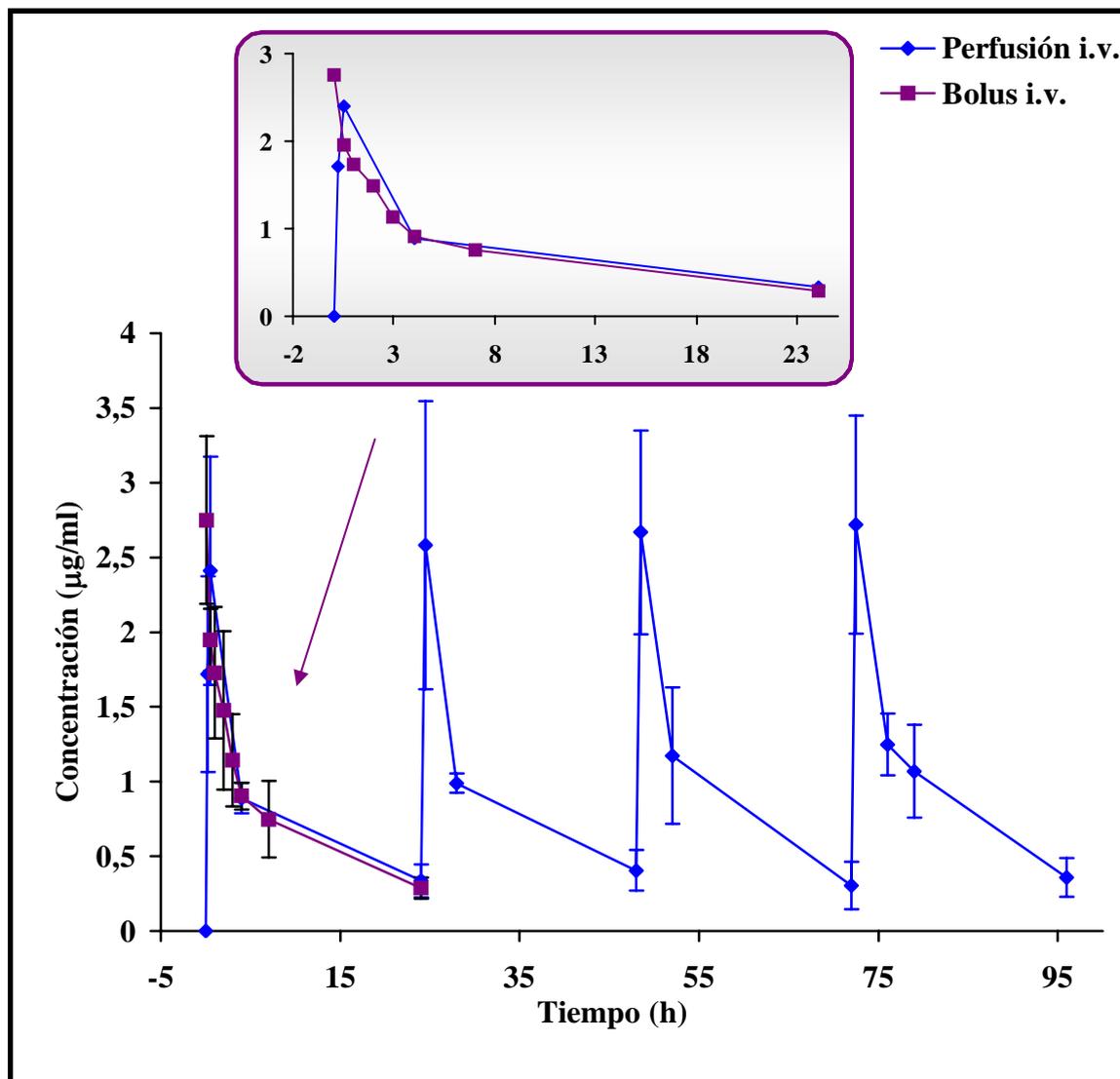


Figura 80. Representación gráfica de los valores medios y las desviaciones estándar de los niveles plasmáticos de AmB tras la administración por perfusión i.v. de la microemulsión C en una dosis de 1 mg/kg durante 4 días, junto con la administración en bolus i.v. de la misma formulación y a la misma dosis.

Por el contrario existe una diferencia muy grande en el valor de la C_{max} tras la administración por perfusión i.v. y tipo bolus, obteniéndose en esta última valores mucho mayores. Las causas de este comportamiento anómalo, pueden ser dos. La primera es que con la administración por perfusión i.v., a medida que vamos administrando la dosis indicada, durante el tiempo de perfusión también se va produciendo una eliminación del fármaco, y por lo tanto la C_{max} obtenida inicialmente tiene un valor menor, que como vemos se va elevando paulatinamente hasta llegar a la concentración en estado estacionario. La

segunda causa puede ser debida a la dificultad encontrada a la hora de realizar la administración por perfusión i.v., de obtener un flujo constante y similar en la administración del fármaco para todos los conejos y en ambas formulaciones. Esto ha podido provocar irregularidades en el flujo que hayan hecho que las diferencias en la C_{\max} se acentúen. Y posiblemente esto haya sucedido en mayor manera en la formulación F, que fue la primera con la que se realizó el estudio de perfusión y por ello observamos una gran diferencia entre la C_{\max} obtenida por perfusión i.v. y la C_{\max} obtenida por la administración tipo bolus i.v.

ESTUDIOS DE TOXICIDAD AGUDA Y SUBAGUDA DE MICROEMULSIONES DE ANFOTERICINA B

El fin de este estudio toxicológico ha sido el de comprobar el comportamiento de nuevas formulaciones de AmB en forma de microemulsión. En una primera parte se determinó la toxicidad aguda en dosis única y posteriormente se determinó la toxicidad subaguda tras la administración de dosis múltiples de las microemulsiones de AmB en comparación con la formulación comercial Fungizona[®].

Las pruebas de toxicidad por administración reiterada de un fármaco se deben realizar con 2 especies de mamíferos, una de las cuales no deberá pertenecer al orden de los roedores, según el Real Decreto 767/1993. Y la elección de la vía de administración deberá hacerse teniendo en cuenta la prevista en el uso terapéutico y las posibilidades de absorción, por ello en este estudio toxicológico se emplearon dos tipos distintos de animales de laboratorio: ratones y conejos, y el fármaco se administró por vía parenteral. A continuación se describirá cada uno de los estudios realizados.

1. TOXICIDAD AGUDA EN DOSIS ÚNICA EN RATONES

Una prueba de toxicidad aguda implica un estudio cualitativo y cuantitativo de los fenómenos tóxicos que puedan derivarse de una administración única de la sustancia activa contenida en la proporción y en el estado fisicoquímico en que esté presente en el producto en su presentación efectiva. Por ello se determinó la toxicidad aguda de las distintas formulaciones diseñadas y desarrolladas en el capítulo cuarto, en comparación con la formulación comercial Fungizona[®] mediante el cálculo de la dosis letal 50 (DL₅₀).

1.1. Animales de experimentación

Para realizar este estudio toxicológico se emplearon como animales de experimentación, ratones machos albinos CR1, de un peso comprendido entre 25 y 30 g. Los animales fueron alojados en grupos de 10 en cajas de plástico a una temperatura de 25°C y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, y recibieron comida y bebida sin restricciones durante todo el estudio excepto en el momento en el que se les realizó la administración del fármaco. Los animales tuvieron un periodo de adaptación de cuatro días en el animalario previo al estudio toxicológico.

La administración intravenosa del fármaco tipo bolus en un volumen de 0,1 ml, se realizó por la vena marginal caudal. Para cada tipo de formulación y cada dosis se emplearon 10 ratones cuya supervivencia fue seguida durante 45 días y el recuento de animales muertos se realizó inmediatamente después de la administración.

1.2. Dosis de fármaco administradas

Las formulaciones empleadas para estos estudios fueron:

- **Microemulsión A.** Con una proporción de Brij[®] 96V/lecitina 1,5:1, un porcentaje de agua del 70 % p/p y una concentración de AmB de 2 mg/ml.
- **Microemulsión A1.** Con una proporción de Brij[®] 96V/lecitina 1,5:1, un porcentaje de agua del 70 % p/p y una concentración de AmB de 2 mg/ml.

- **Microemulsión A2.** Con una proporción de Brij[®] 96V/lecitina 1,5:1, un porcentaje de agua del 70 % p/p y una concentración de AmB de 3 mg/ml.
- **Microemulsión A3.** Con una proporción de Brij[®] 96V/lecitina 1,5:1, un porcentaje de agua del 70 % p/p y una concentración de AmB de 4 mg/ml.
- **Microemulsión A'.** Con una proporción de Brij[®] 96V/lecitina 1,5:1, un porcentaje de agua del 70 % p/p sin AmB.
- **Microemulsión B.** Con una proporción de Brij[®] 96V/lecitina 1,5:1, un porcentaje de agua del 65 % p/p y una concentración de AmB de 2 mg/ml.
- **Microemulsión B'.** Con una proporción de Brij[®] 96V/lecitina 1,5:1, un porcentaje de agua del 65 % p/p sin AmB.
- **Fungizona[®] (Formulación F).** Formulación comercial de AmB acomplejada con deoxicolato sódico.

Se tomaron las microemulsiones A, A1, A2, A3 y B con una concentración de AmB determinada y se diluyeron en suero glucosado fisiológico al 5% p/v hasta obtener sistemas con la concentración de fármaco adecuada a las dosis a administrar que fueron de 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 y 4 mg/kg, teniendo en cuenta que los animales pesaban aproximadamente 30 g y el volumen medio de inyección fue de 0,1 ml. Conviene elegir las dosis máximas de manera que con ellas se hagan aparecer los efectos nocivos, ya que de este modo las dosis menores permitirán fijar el margen de tolerancia del producto en el animal.

Las microemulsiones sin AmB se diluyeron en suero glucosado fisiológico al 5% p/v hasta obtener sistemas con una concentración de microemulsión de 2 mg/kg, teniendo en cuenta que los animales pesaban aproximadamente 30 g y el volumen medio de inyección fue de 0,1 ml.

En el caso de la formulación F, las dosis a administrar se prepararon según las instrucciones del fabricante, usando agua estéril para la resuspensión seguida de una posterior dilución en suero glucosado fisiológico al 5% p/v, hasta obtener la concentración de fármaco adecuada a las dosis a administrar que fueron de 1 y 2 mg/kg.

1.3. Esterilización de las muestras

La necesidad de esterilizar las microemulsiones, condicionada por la vía de administración, así como la imposibilidad de llevar a cabo dicho proceso por aporte de calor, seco o húmedo y la no disponibilidad de otros métodos de esterilización, obligaron a someter a las muestras a una filtración esterilizante a través de filtros de membrana apirógenos, con un diámetro de poro de 0,22 μm , en el momento de la inyección de la forma farmacéutica, con el fin de asegurar la completa esterilidad de la misma.

Se comprobó que tras esta filtración esterilizante, un pequeño porcentaje de fármaco quedaba retenido en los filtros y por lo tanto se valoró por HPLC dicho porcentaje para cada una de las formulaciones siguiendo el método descrito con anterioridad para estudios semejantes. El ensayo se realizó por triplicado, al igual que el número de determinaciones por muestra.

Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Tabla 58 y como se puede observar, un 15 % del fármaco incorporado se perdía por filtración y por ello se reajustaron las dosis con objeto de compensar dichas pérdidas. Esta pérdida de fármaco por filtración

podía ser debida a que una parte de la AmB incorporada a la microemulsión no quedase incorporada a la fase interna de la microemulsión, sino que permaneciese en la interfase unida a la lecitina, y parte de esta AmB unida más débilmente al tensioactivo, es la que posiblemente se pierda tras el proceso de filtración esterilizante, al pasar las formulaciones objeto de estudio a través de membranas filtrantes con diámetro de poro tan pequeño.

Formulación	Recuperación (%)
A	84,21 ± 2,14
A1	83,91 ± 1,65
A2	86,10 ± 1,20
A3	85,41 ± 0,57
B	84,88 ± 2,73

Tabla 58. Porcentaje de recuperación de las formulaciones esterilizadas por filtración.

Así mismo se comprobó que el proceso de filtración no afectaba al tamaño de gotícula de la microemulsión y para dicho estudio se tomaron muestras sometidas a filtración esterilizante por triplicado y se analizaron por Espectroscopía de Correlación Fotónica o PCS según el método empleado para estudios semejantes en el capítulo cuarto de diseño y caracterización de microemulsiones de AmB. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Tabla 59 y demostraron que no se observaban diferencias significativas en el tamaño medio y distribución del tamaño de gotícula entre las microemulsiones antes y después del proceso de esterilización por filtración.

Formulación	Microemulsiones sin filtrar	Microemulsiones filtradas
	Tamaño (nm) (IP)	Tamaño (nm) (IP)
A	36,4 (0,602)	41,6 (0,509)
A1	47,3 (0,515)	46,9 (0,614)
A2	55,6 (0,580)	47,1 (0,517)
A3	42,9 (0,619)	36,9 (0,589)
A'	38,9 (0,496)	37,5 (0,588)
B	51,8 (0,498)	43,7 (0,491)
B'	43,8 (0,503)	39,2 (0,528)
C	34,0 (0,565)	30,6 (0,572)

Tabla 59. Comparación del tamaño de gotícula de las formulaciones esterilizadas por filtración frente a las no esterilizadas.

1.4. Cálculo de la Dosis Letal 50 (DL₅₀).

Para cada microemulsión, los datos de las dosis administradas, el número total de ratones que recibieron cada dosis y el número de ratones muertos con cada dosis, permitieron calcular la dosis letal 50, DL₅₀.

El cálculo de la DL₅₀ está basado en la elección de un modelo binario de tipo probit para explicar el comportamiento binario, vivir o morir, de los animales, en función de la dosis administrada. Los parámetros del modelo se estimaron a partir de los datos experimentales de dosis y de supervivencia de los animales, mediante el método de máxima verosimilitud.

El modelo binario que se plantea para el cálculo de la dosis letal 50 es el siguiente:

$$Y_i = \begin{cases} 1 & \text{if } Y_i^* > I_{\max} \\ 0 & \text{if } Y_i^* \leq I_{\max} \end{cases}$$

donde Y_i es la variable binaria observada que toma el valor 1 si el animal muere y el valor 0 en caso contrario. Y_i^* es una variable no observable que cuantifica el grado de intoxicación sufrido por el organismo de cada animal; I_{\max} es la intoxicación máxima tolerada.

Se acepta que la variable latente que cuantifica la intoxicación está relacionada linealmente con la dosis:

$$Y_i^* = \alpha + \beta * x_i + \varepsilon_i$$

donde x_i representa el logaritmo de la dosis administrada al animal i , α y β son los parámetros del modelo y ε_i es termino correspondiente al error aleatorio.

De acuerdo con el modelo la probabilidad de que el animal muera es:

$$\Pr(Y_i = 1 | x_i, \beta, c - \alpha) = \Pr(Y_i^* > c) = \Pr(\alpha + \beta * x_i + \varepsilon_i > c) = 1 - F(c - \alpha + \beta * x_i)$$

donde la función de distribución $F(c - \alpha + \beta * x_i)$ es la normal estándar.

Análogamente la probabilidad de que un animal continúe viviendo para una determinada dosis administrada es:

$$\Pr(Y_i = 0 | x_i, \beta, c - \alpha) = \Pr(Y_i^* \leq c) = \Pr(\alpha + \beta * x_i + \varepsilon_i \leq c) = F(c - \alpha + \beta * x_i)$$

En los modelos binarios de probabilidad lineal se asume que la función de distribución $F(.)$ es una función lineal de x_i ; si $F(.)$ corresponde a una distribución normal estándar el modelo binario resultante es de tipo probit.

El método de Reed y Muench consiste en anotar el número de animales vivos y muertos para cada una de las dosis ensayadas (Reed, L. J. et al. 1938). A partir de estas

frecuencias absolutas, se realiza el cálculo de las frecuencias acumuladas absolutas de vivos para las distintas dosis ensayadas en el sentido de mayor a menor dosis, ya que un animal superviviente a una dosis también sobreviviría a una dosis menor, y el cálculo de animales muertos en el sentido opuesto. Para cada dosis se calcula la proporción de supervivencia, que corresponde al valor tomado por la función de distribución, $F(\cdot)$ como la frecuencia acumulada absoluta de vivos dividido por la suma de las frecuencias acumuladas absolutas de vivos y de muertos (Turner, R. A. 1965).

A continuación se calcula por el método de mínimos cuadrados la relación lineal entre la proporción de supervivencia y el logaritmo de las dosis utilizando los datos de proporción de supervivencia y de las dosis correspondientes para aquellos dos datos entre los cuales se sitúa la proporción de supervivencia 0,5 (Turner, R. A. 1965)

Finalmente se estima el valor de la dosis asociado al valor de proporción de supervivencia 0,5; este valor de dosis corresponde a la dosis letal media calculada por el método de Reed y Muench y Turner.

Este método por ser un modelo de probabilidad lineal tiene varios inconvenientes. Entre ellos cabe destacar la heterocedasticidad que podría resolverse por el método de mínimos cuadrados generalizados factibles (Greene, W. H. 1998). Un inconveniente más serio es la imposibilidad de asegurar que las predicciones del modelo parezcan verdaderas probabilidades ya que no es posible restringir el valor estimado para la variable dependiente al intervalo $[0,1]$.

Según Greene, el modelo de probabilidad lineal se utiliza cada vez menos por estos inconvenientes. Se debería utilizar únicamente para comparar sus resultados con los obtenidos utilizando métodos más adecuados.

1.4.1. Modelo binario de tipo probit.

Si se asume que la función de distribución $F(\cdot)$ es una función de distribución normal estándar el modelo binario resultante es de tipo probit.

Este enfoque es el adoptado por el método de Miller y Tainter (Miller, L. C. et al. 1944). Tras anotar el número de animales vivos y muertos para cada dosis ensayada, estos autores calculan la proporción de animales vivos para cada una de estas dosis, es decir calculan $\Pr(Y_i = 0 | x_i, \beta, c - \alpha)$ para distintos valores de x_i . Acudiendo a la tabla que convierte la proporción de respuesta en unidades probit, se calcula para cada valor de logaritmo de dosis, x_i , la unidad probit correspondiente. Por último se construye la gráfica de probit en ordenadas y el logaritmo de dosis en abscisas, y se determina el valor de dosis que corresponde al probit 5. Este valor de dosis corresponde a la dosis letal media calculada por el método de Miller y Tainter.

1.4.2. Estimación del modelo binario de tipo probit por el método de máxima verosimilitud (Greene, W. H. 1998).

Los parámetros del modelo de respuesta binaria tipo probit se pueden estimar por el método de máxima verosimilitud utilizando los datos experimentales de supervivencia y de dosis administradas a una muestra aleatoria de n animales.

Cada observación i de la muestra de tamaño n se considera que es la realización individual de una variable aleatoria Y_i con distribución de Bernoulli con probabilidad $\Phi(c - \alpha - x_i\beta)$ para el suceso “vivir” y $1 - \Phi(c - \alpha - x_i\beta)$ para el suceso “morir”. Por lo tanto la función de probabilidad para la observación i es:

$$\begin{aligned} \Pr(Y_i = 1 | x_i, \beta, c - \alpha) &= 1 - \Phi(c - \alpha - x_i\beta) \\ \Pr(Y_i = 0 | x_i, \beta, c - \alpha) &= \Phi(c - \alpha - x_i\beta) \end{aligned}$$

Puesto que las n observaciones son independientes, la función de densidad conjunta de toda la muestra es igual al producto de las funciones de densidad individuales. La función de densidad conjunta se denomina función de verosimilitud, L , y da la probabilidad de observar esta muestra en particular.

$$L = f(Y_1 = y_1, Y_2 = y_2, \dots, Y_n = y_n | x_1, x_2, \dots, x_n, \beta, c - \alpha) = \prod_{i=1}^n f(Y_i = y_i | x_i, \beta, c - \alpha)$$

El valor de los parámetros β y γ , siendo $\gamma = c - \alpha$, que hace que esta muestra en particular sea la más probable de acuerdo a la función de verosimilitud especificada, es el valor del estimador de máxima verosimilitud. Con otras palabras, el valor de los parámetros que maximiza L es el estimador de máxima verosimilitud.

Los parámetros estimados por el método de máxima verosimilitud se calculan maximizando la función L . Generalmente, para encontrar el estimador de máxima verosimilitud se considera la maximización del logaritmo de la función de verosimilitud, ya que es más fácil trabajar con la función logarítmica que con la función original L . Puesto que la función logarítmica es monótono creciente, los valores que maximizan L son los mismos que los que maximizan $\ln L$. Entonces, la función a maximizar es :

$$\ln L = \sum_{i=1}^n \ln f(Y_i = y_i | x_i, \beta, \gamma) = \sum_{i=1}^n [y_i \ln(1 - \Phi_i) + (1 - y_i) \ln \Phi_i]$$

La condición necesaria de la maximización de $\ln L$, condición que satisface el estimador de máxima verosimilitud, viene dada por las expresiones:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \ln L}{\partial \beta} &= \sum \left[y_i \frac{\frac{\partial \Phi_i}{\partial \beta}}{1 - \Phi_i} + (1 - y_i) \frac{\frac{\partial \Phi_i}{\partial \beta}}{\Phi_i} \right] = 0 \\ \frac{\partial \ln L}{\partial \gamma} &= \sum \left[y_i \frac{\frac{\partial \Phi_i}{\partial \gamma}}{1 - \Phi_i} + (1 - y_i) \frac{\frac{\partial \Phi_i}{\partial \gamma}}{\Phi_i} \right] = 0 \end{aligned}$$

Las ecuaciones de las condiciones de primer orden del problema de maximización serán no lineales y por eso habrá que resolver la maximización con un método iterativo. El estimador de máxima verosimilitud satisface también las condiciones de segundo orden del problema de verosimilitud.

1.4.3. Determinación de la DL₅₀.

Estimados los parámetros del modelo por el método de máxima verosimilitud, se calcula la dosis DL₅₀, esta se define como aquella dosis que produce la muerte del 50 por ciento de los animales que la reciben, por lo que satisface la ecuación:

$$0.5 = 1 - \Phi(\hat{\gamma} - DL_{50}\hat{\beta}) \quad \text{ecuación 1}$$

donde $\hat{\gamma}$ y $\hat{\beta}$ son los valores estimados de los coeficientes $(c - \alpha)$ y β respectivamente.

1.4.4. Comportamiento de la estimación de la DL₅₀ por máxima verosimilitud

Una de las propiedades de los estimadores de máxima verosimilitud es la consistencia. Un estimador τ de un parámetro t es un estimador consistente de t si y solo si τ converge en probabilidad a t , la variable aleatoria x_n converge en probabilidad a una constante c , si $\lim\Pr(|x_n - c| > \varepsilon) = 0$ para cualquier ε positivo. Por tanto el estimador de máxima verosimilitud puede ser algunas veces sesgado para muestras finitas. De ahí que a pesar de ser éste un método muy atractivo por sus propiedades asintóticas, deba compararse el resultado de la dosis letal media estimada por este método con el valor estimado por el método de Miller y Tainter (Miller, L. C. et al. 1944).

En la Tabla 60 se muestran las formulaciones administradas, las dosis, el número total de animales y el número de animales muertos. La mortalidad de los ratones tratados con las microemulsiones A' y B' fue semejante al grupo no tratado (0), y por lo tanto se puede concluir que los excipientes de la formulación no afectaron a la toxicidad de la misma.

Formulación	Dosis	Número total de animales	Número de animales muertos
A	1,0	10	0
	2,0	10	6
	2,5	10	10
A1	1,0	10	0
	2,0	10	0
	2,25	10	0
	2,50	10	1
	3,0	10	10
A2	1,0	10	0
	2,0	10	3
	3,0	10	9
	4,0	10	10
A3	1,0	10	0
	2,5	10	0
	3,0	10	6
	3,5	10	10
B	1,0	10	0
	2,0	10	2
	2,5	10	6
	3,0	10	10
F	1,0	10	0
	2,0	10	10

Tabla 60. Recuento de animales tras administrar distintas dosis de las microemulsiones.

Formulación	β	$c-\alpha$	DL_{50}^a	DL_{50}^b	DL_{50}^c
A	1,813 (0,533)	0,848 (0,382)	1,597	1,656	1,82
A1	31,366 (97,785)	29,582 (89,588)	2,568	2,661	2,73
A2	4,637 (1,490)	3,753 (1,320)	2,247	2,278	2,36
A3	25,114 (54,095)	27,337 (59,435)	2,970	2,910	2,93
B	6,779 (1,988)	5,693 (1,743)	2,316	2,328	2,35
F	18,322 (5906,625)	6,349 (2895,009)	1,414	1,414	1,49

Tabla 61. Coeficientes del modelo binario tipo probit y DL_{50} para cada microemulsión, estimados por máxima verosimilitud, DL_{50}^a , la dosis letal media DL_{50}^b , estimada mediante la aproximación lineal de la función de supervivencia y la dosis letal media DL_{50}^c estimada por un método gráfico.

Para el cálculo de la DL_{50} de las microemulsiones se aplicó el modelo binario probit, estimando los parámetros por el método de máxima verosimilitud. Sustituyendo los valores estimados para β y para $c-\alpha$ en la ecuación 1 se estiman las dosis letales 50 para las diferentes formulaciones. Los resultados de la estimación se presentan en la Tabla 61.

Debido a que el tamaño de las muestras utilizadas para la estimación de las dosis letales es pequeño, se debe verificar que la DL_{50} para cada microemulsión calculada según el método de máxima verosimilitud es insesgada. Para realizar esta comprobación se comparó cada uno de los valores estimados de la DL_{50} con el valor correspondiente de DL_{50} obtenida por el clásico método de Reed y Muench (Tabla 62).

Formulación	Dosis	Número de animales vivos	Número acumulado de animales muertos	Número acumulado de animales vivos	Total	Proporción de supervivencia
A	1,00	10	0	14	14	1,0
	2,00	4	6	4	10	0,4
	2,50	0	16	0	16	0,0
A1	1,00	10	0	39	39	1,0
	2,00	10	0	29	29	1,0
	2,25	10	0	19	19	1,0
	2,50	9	1	9	10	0,9
	3,00	0	11	0	11	0,0
A2	1,00	10	0	18	18	1,0
	2,00	7	3	7	10	0,7
	3,00	1	12	1	13	0,072
	4,00	0	22	0	22	0,0
A3	1,00	10	0	24	24	1,0
	2,50	10	0	14	14	1,0
	3,00	4	6	4	10	0,4
	3,50	0	16	0	16	0,0
B	1,00	10	0	22	22	1,0
	2,00	8	2	12	14	0,857
	2,50	4	8	4	12	0,333
	3,00	0	18	0	18	0,0
F	1,00	10	0	10	10	1,0
	2,00	0	10	0	10	0,0

Tabla 62. Método de Reed y Muench para el cálculo de la dosis letal media de las diferentes microemulsiones.

Como se puede observar en la Tabla 61, los resultados del cálculo de la DL_{50} obtenida por los tres diferentes métodos fue muy semejante, siendo ligeramente mayores los resultados obtenidos por el método gráfico. De todas las microemulsiones estudiadas, aquella con una toxicidad menor resultó ser la formulación A3, seguida de la microemulsión A1. Y todas las microemulsiones fueron mucho menos tóxicas que la formulación comercial Fungizona[®], permitiendo así el tratamiento de micosis sistémicas con dosis mucho más elevadas y disminuyendo con ello el riesgo de formación de resistencia a dicho fármaco.

Otra manera de calcular la dosis letal 50 es mediante un método gráfico en el que se representa la proporción de supervivencia y letalidad y el punto en el que se cruzan equivale a la dosis letal 50 (Figura 81). Los resultados de la DL_{50} obtenidos por este análisis aparecen reflejados en la Tabla 60.

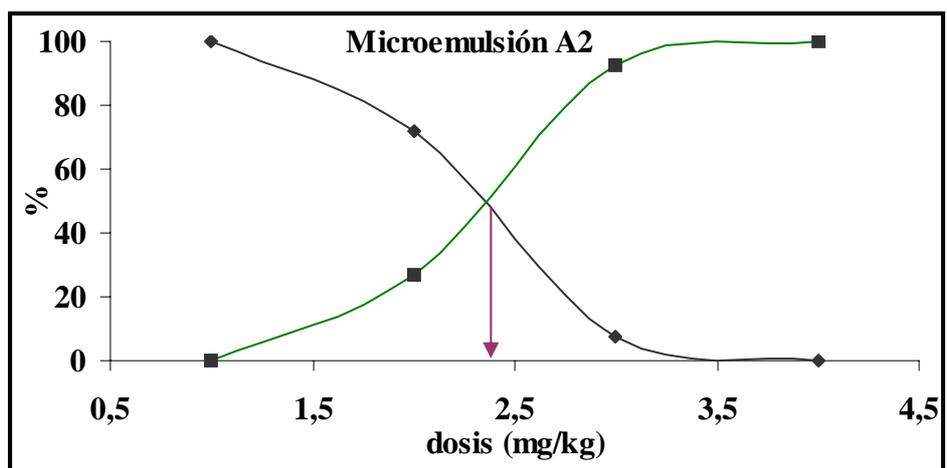
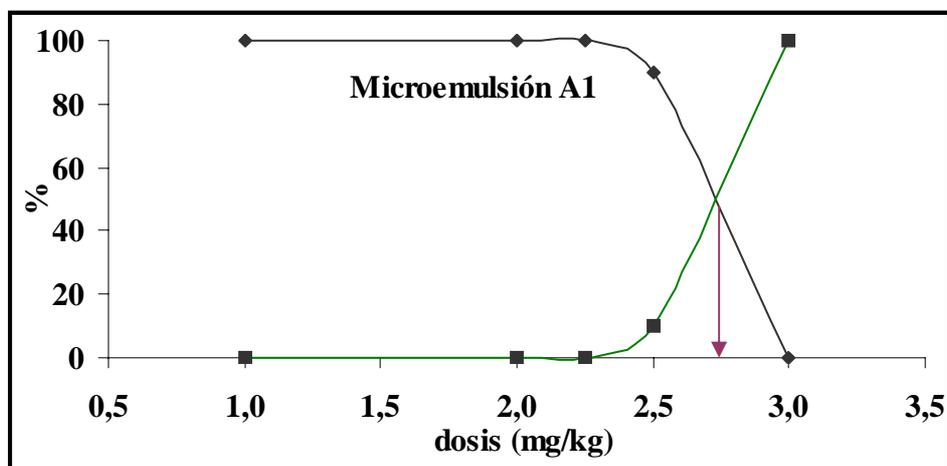
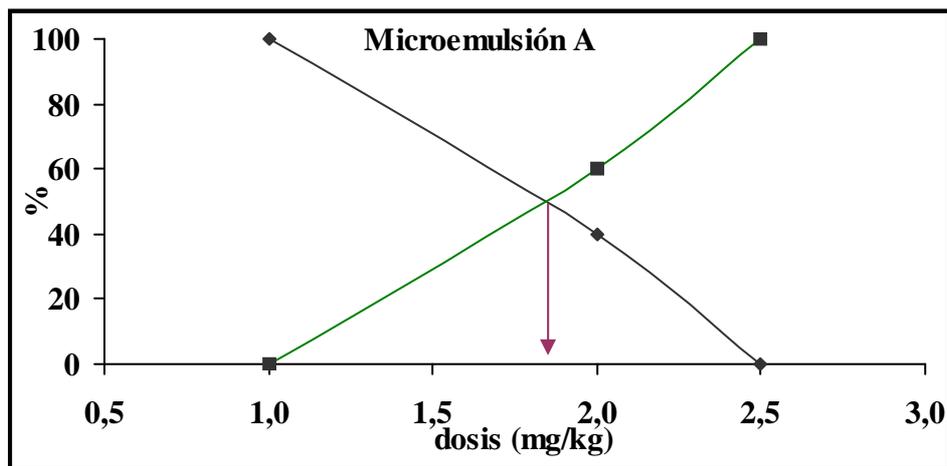


Figura 81. Cálculo de la dosis letal 50 por un método gráfico. (—) Proporción de supervivencia; (—) Proporción de letalidad. La flecha morada indica el valor de la dosis letal 50.

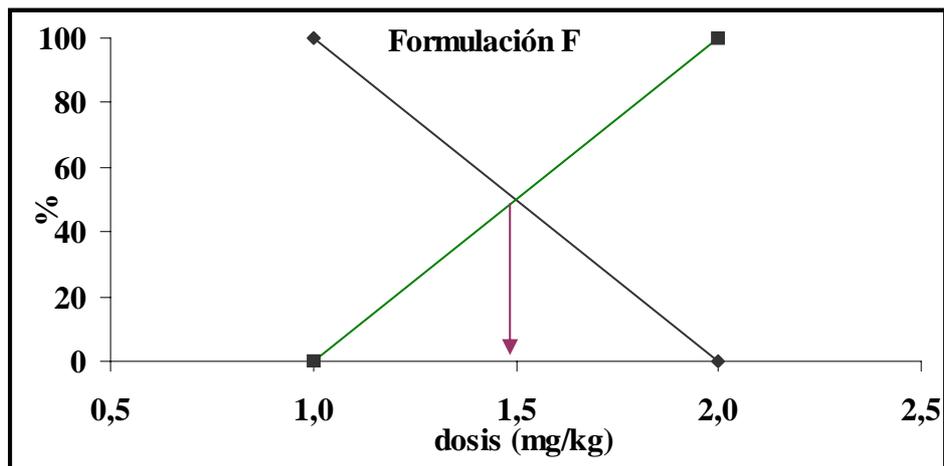
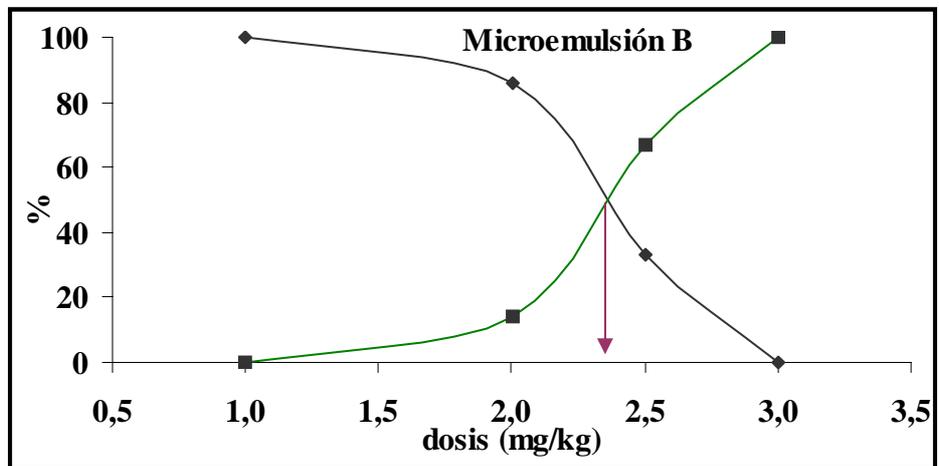
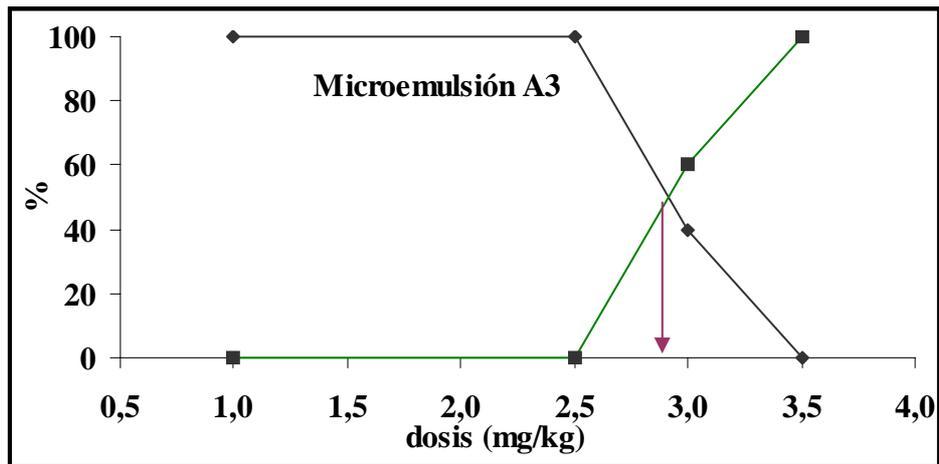


Figura 81. (Continuación) Cálculo de la dosis letal 50 por un método gráfico. (—) Proporción de supervivencia; (—) Proporción de letalidad. La flecha morada indica el valor de la dosis letal 50.

2. TOXICIDAD SUBAGUDA EN DOSIS MÚLTIPLE EN RATONES

Las pruebas de toxicidad por administración continuada tienen por objeto revelar las alteraciones funcionales o patológicas subsiguientes a la administración repetida de la sustancia activa, y establecer las condiciones de aparición de dichas alteraciones en función de la posología. En este estudio se observó los efectos de la AmB en forma de microemulsión tras la administración de la formulación a diferentes dosis en ratones durante un periodo de 5 días.

2.1. Animales de experimentación

Para realizar este estudio toxicológico se emplearon como animales de experimentación, ratones machos albinos CR1, de un peso comprendido entre 25 y 30 g. Los animales fueron alojados en grupos de 10 en cajas de plástico a una temperatura de 25°C y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, y recibieron comida y bebida sin restricciones durante todo el estudio excepto en el momento en el que se les realizó la administración del fármaco. Los animales tuvieron un periodo de adaptación de cuatro días en el animalario previo al estudio toxicológico.

La administración intravenosa del fármaco en bolus en un volumen de 0,1 ml, se realizó por la vena lateral caudal, y la toma de muestra plasmática una vez sacrificados los animales por dislocación cervical, se realizó mediante punción cardiaca. El análisis de dicha muestra se realizó con el total de plasma obtenido de 5 animales a los que se les había administrado la misma formulación a la misma dosis. Para cada tipo de formulación y cada dosis se emplearon 10 ratones cuya supervivencia fue seguida durante 14 días y el recuento de animales muertos se realizó inmediatamente después de la administración.

2.2. Dosis de fármaco administradas

Las formulaciones empleadas para estos estudios fueron:

- **Microemulsión A.** Con una proporción de Brij[®] 96V/lecitina 1,5:1, un porcentaje de agua del 70 % p/p y una concentración de AmB de 2 mg/ml.
- **Microemulsión A'.** Con una proporción de Brij[®] 96V/lecitina 1,5:1, un porcentaje de agua del 70 % p/p sin AmB.
- **Microemulsión B.** Con una proporción de Brij[®] 96V/lecitina 1,5:1, un porcentaje de agua del 65 % p/p y una concentración de AmB de 2 mg/ml.
- **Microemulsión B'.** Con una proporción de Brij[®] 96V/lecitina 1,5:1, un porcentaje de agua del 65 % p/p sin AmB.
- **Microemulsión C.** Con una proporción de Tween 80/lecitina 2:1, un porcentaje de agua del 60 % p/p y una concentración de AmB de 2 mg/ml.
- **Microemulsión C'.** Con una proporción de Tween 80/lecitina 2:1, un porcentaje de agua del 60 % p/p sin AmB.
- **Fungizona[®] (Formulación F).** Formulación comercial de AmB acomplejada con deoxicolato sódico.

Se tomaron las microemulsiones A, B y C con una concentración de AmB de 2 mg/ml y se diluyeron en suero glucosado fisiológico al 5% p/v hasta obtener sistemas con

la concentración de fármaco adecuada a las dosis a administrar que fueron de 0,5, 1, 1,5, 2 y 3 mg/kg.

Las microemulsiones sin AmB se diluyeron en suero glucosado fisiológico al 5% p/v hasta obtener sistemas con una concentración de microemulsión de 2 mg/kg, teniendo en cuenta que los animales pesaban aproximadamente 30 g, y el volumen medio de inyección fue de 0,1 ml.

En el caso de la formulación F, las dosis a administrar se prepararon según las instrucciones del fabricante, usando agua estéril para la resuspensión seguida de una posterior dilución en suero glucosado fisiológico al 5% p/v, hasta obtener la concentración de fármaco adecuada a las dosis a administrar que fueron de 1 y 2 mg/kg.

2.3. Análisis de las muestras

Los animales recibieron 5 dosis consecutivas durante 5 días (1 dosis cada 24 horas) de las distintas formulaciones A, B y C de AmB a las dosis de 0,5, 1, 1,5, 2 y 3 mg/kg, para las microemulsiones A', B' y C' sin AmB la dosis fue de 2 mg/kg y para la formulación F la dosis fue de 1 y 2 mg/kg.

Tras la administración de la quinta dosis de fármaco, 5 de los 10 animales estudiados por cada dosis fueron sacrificados, y se tomaron muestras plasmáticas de cada uno de los animales mediante punción cardiaca. Así mismo para el grupo de animales a los que se les administró la microemulsión C, se extrajeron los riñones de cada animal y se fijaron en una solución tampón al 10% en formol, posteriormente se introdujeron en una solución de parafina, se seccionaron en cortes de 4 μ m y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Todas las muestras se analizaron microscópicamente y la puntuación del grado de las lesiones se realizó objetivamente, sin conocimiento del grupo tratado según el método empleado previamente por Fielding y sus colaboradores (Fielding, R. M. et al. 1992).

Una semana después de haber sido administrada la última dosis de fármaco se sacrificaron los animales restantes (como máximo 5), y se obtuvieron muestras plasmáticas de todas las formulaciones y para los animales a los que se les administró la microemulsión C, se analizaron los riñones microscópicamente según el protocolo descrito anteriormente.

Con las muestras plasmáticas obtenidas se analizó el contenido de hemoglobina y de creatinina plasmática. Debido a la hemólisis producida en las muestras plasmáticas obtenidas por punción cardiaca en los animales de experimentación, fue imposible obtener resultados fiables y sin interferencias de otros parámetros analizados tales como la urea, la Alanina aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST), γ -Glutamiltanspeptidasa (GGT) y Fosfatasa alcalina (ALP).

2.4. Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Tabla 63. En ella aparecen descritas las formulaciones empleadas, las dosis administradas y el porcentaje de supervivencia obtenido.

Como se puede observar en esta Tabla, la microemulsión C resultó ser la menos tóxica, con un porcentaje de supervivencia de 100% tras la administración de una dosis de 3 mg/kg durante 5 días, seguida de las microemulsiones B y A, que presentaron un

porcentaje de supervivencia de 60 y 50 respectivamente, tras la administración de una dosis 2 mg/kg durante 5 días y por último la formulación comercial F que fue la más tóxica, presentando un porcentaje de supervivencia de 0 tras la administración de una dosis de 2 mg/kg durante 5 días.

Formulación	Dosis/día (mg/kg)	Dosis total de AmB (mg/kg)	Ratones inyectados	Ratones fallecidos en última dosis	Ratones fallecidos tras 7 días	% Supervivencia
C	0,5	2,5	10	0	0	100
	1	5	10	0	0	100
	1,5	7,5	10	0	0	100
	2	10	10	0	0	100
	3	15	10	0	0	100
C'	2	-	10	0	0	100
A	0,5	2,5	10	0	0	100
	1	5	10	0	0	100
	1,5	7,5	10	0	0	100
	2	10	10	5	0	50
	3	15	10	10	0	0
A'	2	-	10	0	0	100
B	0,5	2,5	10	0	0	100
	1	5	10	0	0	100
	1,5	7,5	10	0	0	100
	2	10	10	4	0	60
	3	15	10	10	0	0
B'	2	-	10	0	0	100
F	1	5	10	0	0	100
	2	10	10	10	0	0

Tabla 63. Porcentajes de supervivencia obtenidos tras la administración de diferentes formulaciones de AmB a distintas dosis durante 5 días.

Las microemulsiones A', B' y C' presentaron un porcentaje de supervivencia de 100 tras ser administradas durante 5 días a grupos de 10 ratones cada una, lo que indica que la formulación sin AmB carece de toxicidad a las dosis estudiadas.

A continuación en la Figura 82 se puede observar la diferencia de comportamiento de las distintas formulaciones al ser administradas a una dosis de 2 mg/kg. La microemulsión C fue la menos tóxica y no se produjo la muerte de ningún animal durante el periodo de estudio, por el contrario con la formulación F al tercer día de su administración con una dosis de 2 mg/kg, el 40% de los animales tratados había muerto, y al quinto día de tratamiento todos los animales fallecieron, lo que nos permite comprobar el alto grado de toxicidad de esta formulación tras su administración por vía endovenosa.

Las microemulsiones A y B presentaron un comportamiento similar, siendo ligeramente menos tóxica la microemulsión B, ya que al cabo de 5 días de tratamiento el

porcentaje de letalidad fue del 40% en comparación con el 50% presentado por la microemulsión A.

Por lo tanto en este estudio se ha podido comprobar la diferencia existente entre las microemulsiones y la formulación F en relación a su nivel de toxicidad tras la administración de una dosis múltiple durante 5 días. De todas las microemulsiones estudiadas, fue la microemulsión C aquella que presentó un comportamiento toxicológico mucho menor, y por ello fue en esta formulación donde se realizó un estudio microscópico de los riñones con el fin de detectar diferencias significativas con respecto a la formulación F. No se realizó este estudio en el resto de las formulaciones ya que la dosis en la que no se producía la muerte de ninguno de los animales tras su administración durante 5 días, era muy próxima a la dosis presentada por la formulación F, y por lo tanto la diferencia toxicológica no era muy grande.

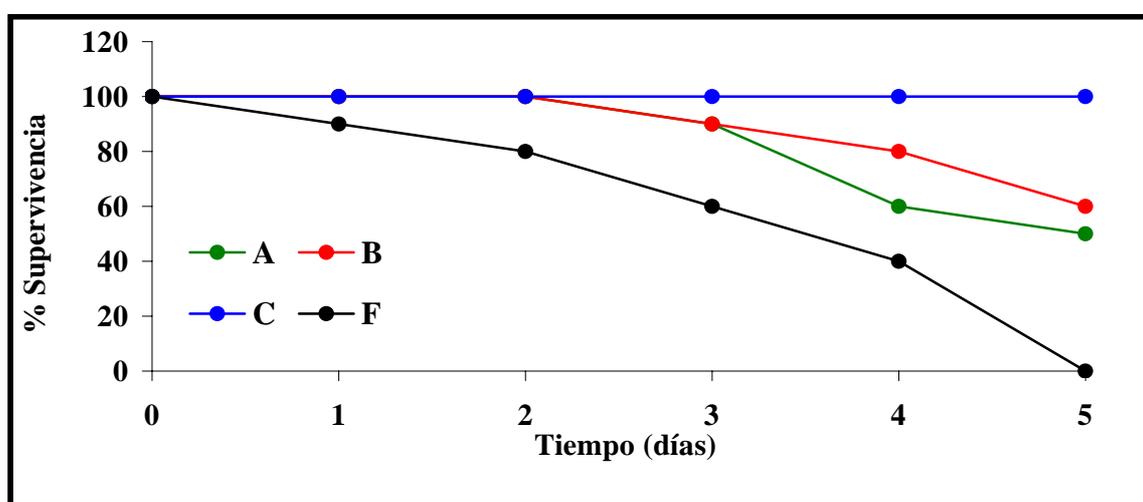


Figura 82. Porcentaje de supervivencia presentado por las formulaciones con AmB tras la administración de una dosis de 2 mg/kg durante 5 días.

2.5. Análisis renal histopatológico

En este estudio se analizaron microscópicamente los riñones de los tras recibir durante 5 días una dosis de 2 mg/kg de la microemulsión C', una dosis de 1 mg/kg de la formulación F y las dosis de 1, 1,5, 2 y 3 mg/kg de la microemulsión C. Se analizaron los riñones de 5 de los ratones tras recibir la quinta dosis de fármaco, y una semana después de finalizado el tratamiento se analizaron los otros 5 ratones con el fin de observar si las lesiones producidas en los riñones al final del tratamiento eran o no irreversibles y por lo tanto si se mejoraba el aspecto histopatológico de los riñones.

Los resultados obtenidos tras el análisis histopatológico aparecen descritos en la Tabla 64.

Resultados	Puntuación de las lesiones tras el tratamiento con: ^a							
	Formulación F		Microemulsión C					
	1 mg/kg		1 mg/kg		2 mg/kg		3 mg/kg	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Congestión vascular	3	3	-	-	-	-	-	-
Hialinosis glomerular	2	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis tubular	2	3	-	1	1	-	1	1
Engrosamiento de la membrana basal	2	-	-	-	-	-	-	-
Nefrocalcinosis	2	3	-	-	1	-	-	-
Regeneración tubular	-	2	-	1	-	-	-	1

^a La severidad de las lesiones se graduó siguiendo la siguiente escala: 1, mínima; 2, media; 3, moderada; 4, severa; -, lesión no presentada.

Tabla 64. Puntuación de las lesiones encontradas tras el análisis histopatológico microscópico de grupos de 5 ratones examinados tras la administración de la quinta dosis (A) y una semana después de finalizado el tratamiento (B), de la formulación F y la microemulsión C (Fielding, R. M. et al. 1992).

Los animales control que recibieron una dosis de 2 mg/kg de la microemulsión C' no presentaron ningún cambio nefropatológico tras el estudio microscópico realizado. Lo que permite concluir que la microemulsión C en ausencia de AmB no produce efectos toxicológicos a nivel renal.

Los animales sacrificados tras la administración de la quinta dosis de la formulación F presentaron lesiones renales de severidad moderada (Figura 83). Estos riñones se caracterizaron por presentar una congestión vascular generalizada, que se ve con mejor claridad en las zonas del corte histopatológico que presentan un tono más rojizo, un engrosamiento de la membrana basal y una hialinización glomerular (Figura 85B).

También se pudo apreciar en estos riñones una lesión tubular moderada caracterizada por una necrosis parcial de las células epiteliales, incluyendo principalmente la parte ascendente del asa de Henle y la zona distal de los túbulos contorneados distales. Las células tubulares de esta zona presentaron grandes vacuolas citoplasmáticas y núcleos picnóticos. Además se observó un engrosamiento de las membranas basales tubulares y calcificación tubular (Figura 85B).

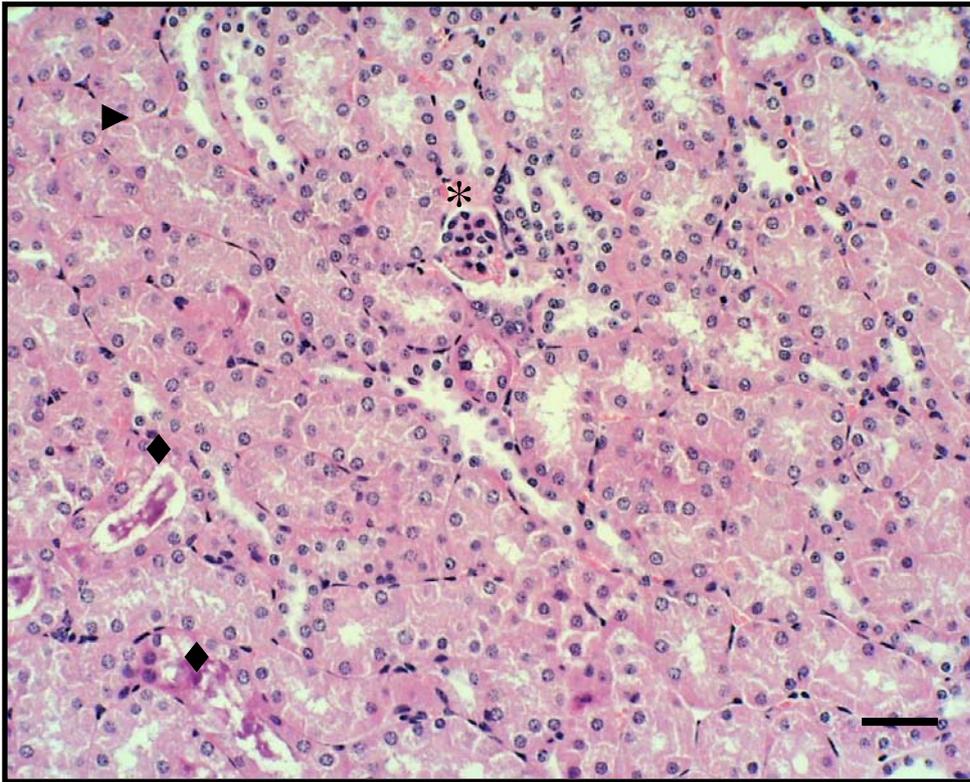


Figura 83. Riñón de ratón expuesto a una dosis de 1 mg/kg de la formulación F durante 5 días, sacrificado tras la administración de la quinta dosis. El corte histopatológico presenta necrosis tubular (cabeza de flecha), nefrocalcinosis (rombo) y hialinización glomerular (asterisco). (Barra 60 μ m).

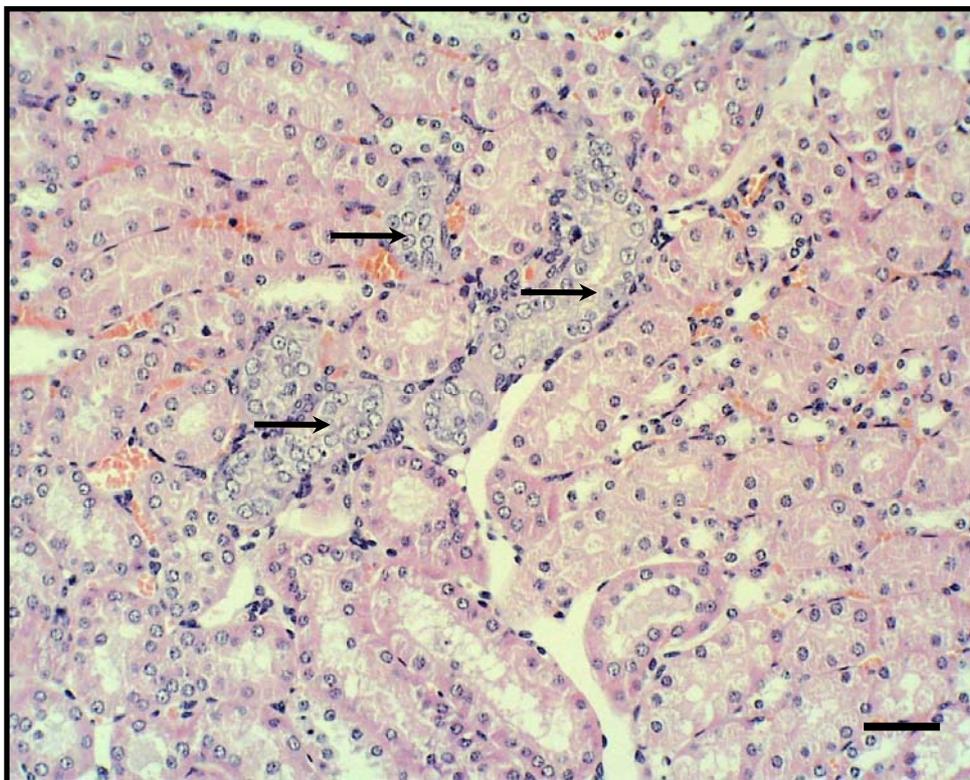


Figura 84. Riñón de ratón expuesto a una dosis de 1 mg/kg de la formulación F durante 5 días, sacrificado 1 semana después de la administración de la quinta dosis. El corte histopatológico presenta zonas de regeneración tubular (flecha) y congestión vascular (zona rojiza). (Barra 60 μ m).

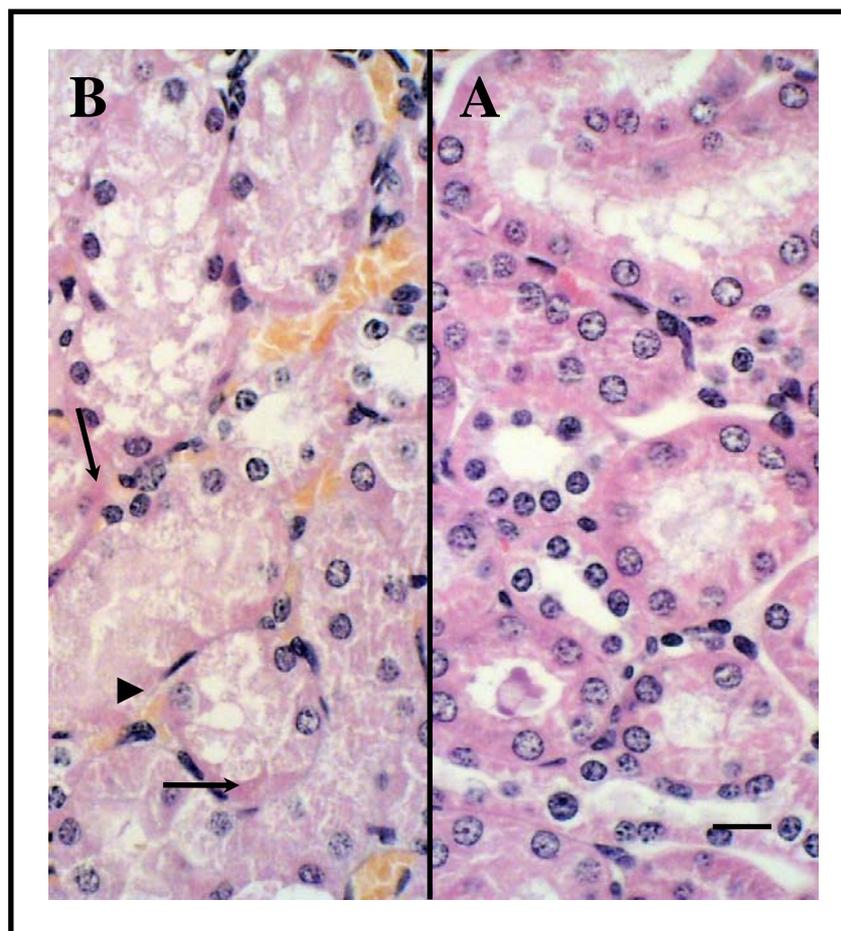


Figura 85. **A:** Riñón de ratón expuesto a una dosis de 2 mg/kg de la microemulsión C durante 5 días, sacrificado tras la administración de la quinta dosis. El corte histopatológico no presenta ninguna alteración morfológica. **B:** Riñón de ratón expuesto a una dosis de 1 mg/kg de la formulación F durante 5 días, sacrificado tras la administración de la quinta dosis. El corte histopatológico presenta necrosis tubular (cabeza de flecha), engrosamiento de la membrana basal (flecha) y congestión vascular (zona rojiza). (Barra 25 μ m).

Los ratones que recibieron la formulación F en una dosis de 1 mg/kg durante 5 días pero fueron sacrificados una semana después de finalizado el tratamiento, presentaron en los cortes histopatológicos áreas de regeneración tubular caracterizadas por la presencia de células epiteliales con un citoplasma basófilo (estas zonas adquieren un color más azulado que el resto de la preparación), un gran núcleo y presencia de mitosis (Figura 84).

En los animales tratados con la microemulsión C a las dosis de 1, 1,5 y 2 mg/kg no se observaron alteraciones histopatológicas significativas tras la administración de la quinta dosis, o una semana después de finalizado el tratamiento, durante el periodo de recuperación (Figura 85A). Tan solo se observó en algunos animales de los diferentes grupos de dosis una mínima necrosis tubular.

Tampoco se observaron lesiones histológicas significativas en aquellos animales que recibieron una dosis de 3 mg/kg de la microemulsión C durante 5 días, y tan solo en dos de los 10 riñones analizados una semana después de la administración del fármaco, se observó una mínima e inespecífica área de hiperplasia en el asa de Henle. También se pudo apreciar una mínima regeneración renal tubular en algunos de los riñones analizados una semana después de finalizado el tratamiento, lo que puede indicar que ha habido un pequeño daño histológico reversible al final del tratamiento que ha podido ser corregido en una semana de ausencia del fármaco.

Con este estudio se ha podido demostrar que la AmB incorporada en la microemulsión C es segura y bien tolerada sin observarse efectos adversos agudos en una dosis de 3 mg/kg cuando se administra a ratones sanos. Ya que mientras que con una dosis de 0,125 mg de la formulación F se producen daños tubulares y degeneración glomerular, una dosis de 0,375 mg de la microemulsión C no produce lesiones histológicas severas que afecten a la estructura renal a pesar de que esta dosis es 3 veces superior a la de la formulación F.

El mecanismo de acción por el que las microemulsiones de AmB atenúan la toxicidad de dicho fármaco en células mamíferas no ha sido descrito con claridad todavía, pero se piensa que puede ser similar al comportamiento que presentan los complejos lipídicos de AmB, ya que su composición es muy similar conteniendo ambas formulaciones fosfatidilcolina en su estructura.

2.6. Análisis de los parámetros sanguíneos

Tal y como se ha dicho previamente, los únicos parámetros sanguíneos que pudieron ser analizados sin la interferencia de la hemólisis producida por la extracción de sangre fueron la creatinina sérica y la hemoglobina.

La hemoglobina es un parámetro sanguíneo relacionado directamente con la aparición de efectos adversos ejercidos por la AmB, ya que la AmB puede producir en un porcentaje significativo de pacientes una depresión o daño en la médula ósea que provoca una anemia hemolítica y por lo tanto un descenso en el valor de este parámetro (Walsh, T. J. et al. 1998).

Los valores de hemoglobina obtenidos aparecen reflejados en la Tabla 65. Como se puede observar, no todos los valores de hemoglobina se encuentran comprendidos entre 10 y 17 g/dl, que es el rango fisiológico para esta especie animal según se indica en la literatura, pero los valores que se encuentran fuera del rango están muy próximos al valor de 10 g/dl (Wolfensohn, S. et al. 1998). (El control presentó un valor de hemoglobina de $9,88 \pm 0,868$ g/dl).

El valor de hemoglobina para la dosis de 1,5 mg/kg de la microemulsión C presentó un valor ligeramente por debajo de 10 g/dl que fue de 9,677 g/dl, pero una semana después de finalizado el tratamiento los valores alcanzaron los niveles fisiológicos, excepto para la dosis de 1 mg/kg de la microemulsión C cuyo valor una semana después de finalizado el tratamiento presentó un valor de 9,215 g/dl. El valor de hemoglobina para la microemulsión C sin AmB en una dosis de 2 mg/kg al finalizar el tratamiento y presentó un valor de 9,554 g/dl, el cual se encuentra discretamente por debajo de los límites fisiológicos normales.

Estos resultados obtenidos para la hemoglobina se encuentran todos por encima de una concentración de 9 g/dl, prácticamente es el valor fisiológico normal que presentan estos animales, y por lo tanto se puede concluir que mediante el estudio de la hemoglobina en plasma no se observan datos que reflejen una posible depresión de la médula ósea como efecto adverso asociado a la administración de un tratamiento continuado con dosis múltiples de AmB durante un periodo de 5 días.

Formulación y dosis (mg/kg)	Creatinina (mg/dl)		Hemoglobina (g/dl)	
	A	B	A	B
Control^a	0,55 ± 0,04	0,60 ± 0,08	11,50 ± 0,80	9,88 ± 0,86
Microemulsión C'				
2	0,40 ± 0,08	0,30 ± 0,04	10,25 ± 0,58	11,28 ± 0,41
Formulación F				
1	0,30 ± 0,07	0,40 ± 0,06	11,91 ± 0,30	10,42 ± 0,24
Microemulsión C				
1	0,30 ± 0,07	0,40 ± 0,08	10,56 ± 1,41	9,21 ± 1,13
1.5	0,40 ± 0,07	0,70 ± 0,07	9,68 ± 0,74	10,52 ± 1,33
2	0,30 ± 0,05	0,50 ± 0,06	10,93 ± 0,64	10,00 ± 1,21
3	0,40 ± 0,06	0,60 ± 0,04	9,15 ± 0,52	10,30 ± 0,46
Microemulsión A				
2	0,70 ± 0,06	0,40 ± 0,05	10,35 ± 0,13	10,87 ± 0,60
Microemulsión B				
2	0,50 ± 0,08	0,30 ± 0,07	11,11 ± 0,38	10,58 ± 0,73

^a Animales sanos

Tabla 65. Valores de creatinina y de hemoglobina sérica en ratones recibiendo distintas formulaciones de AmB en diferentes dosis tras cinco días de tratamiento (A) y una semana después de finalizado el tratamiento (B).

Los valores de creatinina obtenidos aparecen reflejados en la Tabla 65. Como se puede observar, los valores de creatinina se encuentran todos comprendidos entre 0,3 y 1 mg/dl, que es el rango fisiológico para esta especie animal (Wolfensohn, S. et al. 1998).

Los resultados obtenidos indican que la creatinina sérica no es un marcador tan sensible como el análisis histopatológico puesto que la existencia de daños renales no se ve acompañada de elevaciones patológicas de dicho parámetro. La causa principal de este fenómeno puede ser debido a la corta duración del tratamiento con AmB en ratones (5 días).

Para la microemulsión C y la formulación F se produce un incremento en el valor de la creatinina desde la administración de la quinta dosis de fármaco, hasta finalizar el periodo de recuperación, una semana después de finalizado el tratamiento. Esta variación en los niveles de creatinina se encuentra dentro del rango de la normalidad, y por lo tanto no se observan con efectos nefrotóxicos tras la administración de ambas formulaciones. Por el contrario, para las microemulsiones A y B se produce un descenso en el valor de la creatinina desde la administración de la quinta dosis de fármaco, hasta finalizar el periodo de recuperación, una semana después de finalizado el tratamiento.

Los valores de creatinina obtenidos tras la administración de la quinta dosis de AmB fueron menores de 0,3 mg/dl para las dosis de 1 y 2 mg/kg de la microemulsión C y los valores de creatinina alcanzaron valores superiores tras el periodo de recuperación de una semana. Por lo tanto de acuerdo con este parámetro no se podría concluir que se ha producido un efecto nefrotóxico en los animales de experimentación tras la administración del fármaco, ya que los valores de creatinina se encuentran dentro del rango fisiológico normal.

3. TOXICIDAD SUBAGUDA EN DOSIS MÚLTIPLE EN CONEJOS

Este estudio de toxicidad se realizó en los conejos a los que se les administró durante 4 días una dosis de 1 mg/kg de la formulación F o la microemulsión C mediante perfusión intravenosa, y a las 96 horas de iniciado el estudio, se les extrajo una muestra de sangre de 4 ml la cual se empleó para realizar el análisis farmacocinético (2 ml) y para el análisis de los parámetros sanguíneos indicadores de una posible nefrotoxicidad (2 ml).

3.1. Animales de experimentación

Para realizar los estudios de toxicidad en dosis múltiple se emplearon como animales de experimentación, conejos machos albinos New Zealand, de un peso comprendido entre 2,5 y 3 kg. Los animales fueron alojados en jaulas independientes a una temperatura de 25°C y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, y recibieron comida y bebida sin restricciones durante todo el estudio excepto en el momento en el que se les realizó la administración del fármaco, y durante la toma de muestras sanguíneas. Los animales tuvieron un periodo de adaptación de cuatro días en el animalario previo al estudio farmacocinético y toxicológico.

La administración por perfusión intravenosa del fármaco en un volumen de 30 ml durante 30 minutos, se realizó por la vena lateral de la oreja izquierda, y la toma de muestras en un volumen de 2 ml, se realizó por la vena lateral de la oreja derecha, con el fin de evitar posibles interferencias entre la dosis administrada y las muestras plasmáticas extraídas. Para cada tipo de formulación se emplearon 3 conejos.

3.2. Dosis de fármaco administradas

Las formulaciones empleadas para estos estudios fueron:

- **Microemulsión C.** Con una proporción de Tween 80/lecitina 2:1, un porcentaje de agua del 60 % p/p y una concentración de AmB de 2 mg/ml.
- **Fungizona[®] (Formulación F).** Formulación comercial de AmB acomplejada con deoxicolato sódico.

Para la realización del estudio toxicológico y farmacocinético comparativo de la administración por perfusión i.v. de las formulaciones de AmB frente a la formulación comercial Fungizona[®], durante 4 días se seleccionó a la microemulsión C para realizar dicho estudio por ser la que presentaba mejores características toxicológicas en ratones. Se emplearon dosis de 1 mg/kg para ambas formulaciones.

Para la preparación de la microemulsión cuya concentración en AmB era de 2 mg/ml, se diluyó en suero glucosado en una concentración al 5% p/v hasta obtener una solución con la concentración del fármaco de 1mg/kg, teniendo en cuenta el peso de cada

animal (2,75 kg) y el volumen final a perfundir de 30 ml. La esterilización de las muestras se hizo por filtración esterilizante mediante el uso de filtros de diámetro medio de 0,22 μm , y como queda reflejado en capítulos previos, esta esterilización no afectó al tamaño de gotícula interno de los sistemas dispersos, pero sí a la concentración de principio activo incorporado, por ello se tuvo que reajustar la dosis teniendo en cuenta la cantidad de principio activo retenido en el filtro.

En el caso de la formulación F, la dosis a administrar se preparó según las instrucciones del fabricante, usando agua estéril para la resuspensión seguida de una posterior dilución en suero glucosado fisiológico al 5% p/v, hasta obtener la concentración de fármaco adecuada a las dosis a administrar que fue de 1 mg/kg teniendo en cuenta que el volumen final a perfundir fue de 30 ml.

3.3. Extracción y análisis de las muestras

Para realizar el análisis de los parámetros indicadores de nefrotoxicidad, a las 96 horas de administrada la primera dosis del fármaco se tomaron muestras sanguíneas de aproximadamente 2ml a través de la vena lateral de la oreja derecha, y en esta muestra plasmática se midieron los valores de creatinina, urea, hemoglobina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), γ -glutamiltanspeptidasa (GGT) y fosfatasa alcalina (ALP).

3.4. Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos aparecen reflejados en las Tablas 66 y 67. La diferencia fundamental encontrada entre el estudio toxicológico realizado en ratones, y el realizado en conejos, ha sido principalmente el estado de las muestras plasmáticas tras la extracción a los distintos tipos de animales. Si como ya hemos descrito previamente, las muestras plasmáticas obtenidas en los ratones estaban muy hemolizadas y no se podía calcular el valor de ciertas enzimas, las muestras plasmáticas obtenidas en los conejos se realizaban de una manera mucho menos agresiva a través de la vena lateral de la oreja derecha del conejo, y por lo tanto la hemólisis producida era prácticamente nula, con lo que fue posible el cálculo de las enzimas AST (aspartato aminotransferasa), ALP (fosfatasa alcalina), GGT (γ -glutamiltanspeptidasa) y ALT (alanina aminotransferasa).

Como se puede observar, todos los parámetros están dentro de la normalidad para ambas formulaciones, excepto para el valor de AST obtenido en conejos sanos, cuyo valor es ligeramente inferior al descrito en la literatura (Wolfensohn, S. et al. 1998). En todos los parámetros analizados se obtienen valores muy semejantes para ambos tipos de formulaciones, excepto en el valor de la AST, siendo prácticamente del doble para la microemulsión C (59,7 U/l), aunque ambos valores se encuentran dentro del rango de la normalidad (14-80).

Formulación	Parámetros analizados		
	Urea (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Hemoglobina (g/dl)
C	21,0	1,5	10,6
C	18,0	1,5	13,8
C	21,0	1,6	14,8
Media de C	19,9 ± 1,7	1,5 ± 0,05	12,9 ± 2,1
F	36,0	1,8	10,3
F	26,0	1,2	8,1
F	17,0	1,8	10,8
Media de F	26,3 ± 9,5	1,6 ± 0,3	9,7 ± 1,4
Control	27,0	0,8	12,5
Referencia^{a,b}	17 - 23,5^a 12 - 22^b	0,8 - 1,8^a 1 - 1,6^b	10 - 15,5^a 10,9 - 14,4^b

^aWolfensohn, S. et al. 1998, ^bDerelanko, M. J. et al. 1995.

Tabla 66. Valores obtenidos para los parámetros indicadores de nefrototoxicidad en conejos, tras la administración de una dosis de 1 mg/kg de la microemulsión C o la formulación F durante 4 días mediante perfusión endovenosa.

El valor de la enzima ALT obtenido tras la administración de la microemulsión C durante 4 días (39 U/l), se aproxima más a los valores obtenidos en conejo sano (44 U/l) que el valor obtenido tras la administración de la formulación comercial (31 U/l). Lo mismo sucede para los valores obtenidos de la enzima ALP (Tabla 67).

Formulación	Parámetros analizados (U/l)			
	AST	ALP	GGT	ALT
C	47,0	112,0	3,0	39,0
C	63,0	76,0	4,0	50,0
C	72,0	98,0	3,0	28,0
Media de C	60,6 ± 12,6	95,3 ± 18,1	3,3 ± 0,5	39,0 ± 11,0
F	68,0	77,0	3,0	21,0
F	37,0	81,0	4,0	32,0
F	10,0	80,0	1,0	41,0
Media de F	38,3 ± 29,0	79,3 ± 2,0	2,6 ± 1,5	31,3 ± 10,0
Control	12,0	122,0	1,0	44,0
Referencia^{a,b}	14 - 80^a	40 - 120^b	0 - 10^b	14 - 113^a 25 - 70^b

^aWolfensohn, S. et al. 1998, ^bDerelanko, M. J. et al. 1995.

Tabla 67. Valores obtenidos para las enzimas séricas en conejos, tras la administración de una dosis de 1 mg/kg de la microemulsión C o la formulación F durante 4 días mediante perfusión endovenosa.

Estos estudios toxicológicos tanto en ratones como en conejos, nos han permitido caracterizar y describir el comportamiento de nuevas formulaciones de AmB en forma de microemulsión en el organismo de animales de experimentación. Gracias al análisis histopatológico se ha podido comprobar que el daño renal causado por la formulación comercial en forma de deoxicolato sódico, es mucho mayor que el causado por las microemulsiones de AmB y por lo tanto, estos resultados hacen de estas nuevas microemulsiones unos sistemas óptimos para la vehiculación de la AmB en el organismo con una posible aplicación y uso a nivel hospitalario.

ESTUDIOS DE EFICACIA DE MICROEMULSIONES DE ANFOTERICINA B

Para realizar los estudios de eficacia de nuevas formulaciones de AmB en forma de microemulsión en comparación con la formulación comercial F (Fungizona[®]) en forma de deoxicolato sódico, se empleó una levadura patógena, *Candida albicans*, en un modelo de infección sistémica en ratón.

El fin de este estudio fue el de comprobar que la AmB en forma de microemulsión era igualmente eficaz que la formulación F y, que el hecho de estar incluida en la microemulsión la hacía menos tóxica frente a infecciones fúngicas a nivel sistémico en organismos vivos.

Se realizaron dos tipos de estudios de eficacia. El primero de ellos se realizó en ratones sanos a los cuales se les administró una dosis elevada de *Candida albicans* y posteriormente en diversos periodos de tiempo se les administró el fármaco en forma de microemulsión o la formulación F y, un segundo estudio en el que se emplearon ratones a los que previamente al estudio de eficacia se les provocó una neutropenia mediante la administración de ciclofosfamida y por lo tanto se les provocaba una infección sistémica que resultaría mucho más virulenta empleando la misma dosis de *Candida*.

1. ESTUDIOS DE EFICACIA EN RATONES SANOS

1.1 Animales de experimentación

Para realizar este estudio de eficacia se emplearon como animales de experimentación, ratones machos albinos CR1, de un peso comprendido entre 25 y 30 g. Los animales fueron alojados en grupos de 10 en cajas de plástico a una temperatura de 25°C y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y recibieron comida y bebida sin restricciones durante todo el estudio excepto en el momento en el que se les realizó la administración del fármaco o se les administró la *Candida*. Los animales tuvieron un periodo de adaptación de cuatro días en el animalario previo al estudio de eficacia.

1.2. Modelo de infección con *Candida albicans*

Para el desarrollo de una infección sistémica fúngica en animales de laboratorio se emplearon cepas SC5314 de *Candida albicans*. Para el crecimiento del hongo se cultivó una cepa de *C. albicans* en placas con un medio mínimo de agar (1% de extracto de levadura, 2% de glucosa y 2 % de agar). Transcurridas 24 horas las células fueron recogidas y lavadas dos veces con una solución tampón salina de fosfato (PBS), y posteriormente se diluyeron en PBS hasta alcanzar la concentración deseada de $2 \cdot 10^6$ CFU (unidades formadoras de colonias)/ml.

Para producir la infección fúngica sistémica se les inyectó a los ratones 0,5 ml de la solución de *C. albicans* en la vena marginal de la cola.

1.3. Dosis de fármaco administradas

Las formulaciones empleadas para estos estudios fueron:

- **Microemulsión C (M-AmB).** Con una proporción de Tween 80/lecitina 2:1, un porcentaje de agua del 60 % p/p y una concentración de AmB de 2 mg/ml.
- **Microemulsión C'.** Con una proporción de Tween 80/lecitina 2:1, un porcentaje de agua del 60 % p/p sin AmB.
- **Formulación F (D-AmB, Fungizona®).** Formulación comercial de AmB acomplejada con deoxicolato sódico.

La administración intravenosa del fármaco tipo bolus en forma de microemulsión o la formulación F, ambas en un volumen de 0,1 ml, se realizó por la vena lateral caudal del ratón. Para cada tipo de formulación y cada dosis se emplearon 10 ratones cuya supervivencia fue seguida durante 28 días y el recuento de animales muertos se realizó inmediatamente después de la administración.

La microemulsión C con una concentración de AmB de 2 mg/ml se diluyó en suero glucosado fisiológico al 5% p/v hasta obtener sistemas con la concentración de fármaco adecuada a las dosis a administrar que fueron de 1, 2 y 3 mg/kg, teniendo en cuenta que los animales pesaban aproximadamente 30 g, y el volumen medio de inyección fue de 0,1 ml.

La microemulsión C' sin AmB se diluyó en suero glucosado fisiológico al 5% p/v hasta obtener sistemas con una concentración de microemulsión de 2 mg/kg, teniendo en cuenta que los animales pesaban aproximadamente 30 g, y el volumen medio de inyección fue de 0,1 ml.

En el caso de la formulación F, la dosis a administrar se preparó según las instrucciones del fabricante, usando agua estéril para la resuspensión seguida de una posterior dilución en suero glucosado fisiológico al 5% p/v, hasta obtener la concentración de fármaco adecuada a la dosis a administrar que fue de 1 mg/kg.

Con el fin de realizar el estudio de eficacia en diferentes condiciones y grados de infección fúngica, la administración de las formulaciones de AmB se realizó a las 24, 48 o 72 horas de iniciada la infección con *C. albicans*.

1.4. Medida de la colonización de las cepas de *Candida albicans* en los órganos diana durante la infección sistémica

El desarrollo de la infección por *C. albicans* se monitorizó mediante el recuento de animales fallecidos, o mediante la evaluación de la carga fúngica (CFU) en los órganos más representativos como son riñones y cerebro (Papadimitriou, J. M. et al. 1986, Ryley, J. F. et al. 1988). Para ello, a los 28 días de iniciado el tratamiento se tomaron por cada grupo 5 animales que fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se extrajeron los riñones y el cerebro y se introdujeron por separado en una solución de 10 ml de PBS. Se realizó un homogenizado de los órganos mediante el empleo de un agitador Ultra Turrax® T25 Basic (IKA Labortechnik) a 20.000 r.p.m., y posteriormente para el homogenizado con los riñones se realizó una dilución 1/11 en PBS. Una vez obtenidos los homogenizados se realizó una siembra de 100 µl de la dilución y de las suspensiones originales en placas de YED (yeast extract-dextrose) con cloranfenicol y se incubaron a 37°C durante 24-48 h.

1.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo para confirmar la significación de los resultados obtenidos y, consecuentemente, la eficacia de la nueva formulación de AmB. Se estimó una función de supervivencia con el tiempo t para conocer la probabilidad de que un ratón sobreviva al menos en el tiempo t . La función de supervivencia se define por la ecuación:

$$S(t) = 1 - F(t) = P(T > t)$$

donde T es una variable aleatoria con una función de distribución $F(t)$. La estimación más común de la distribución de supervivencia es la de Kaplan-Meier (KM):

$$\hat{S}_{KM}(t) = \prod_{t_i < t} \frac{r(t_i) - d(t_i)}{r(t_i)}$$

donde r y d son los números de riesgo y el número de muertes respectivamente.

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier fueron estimadas por la función `survfit` incluida en el paquete estadístico S-PLUS (S-PLUS 2000. MathSoft. Data Analysis Products Division. 1700 Westlake Ave N, Suite 500. Seattle, WA 98109). Los valores medios de CFU de riñones y cerebro se compararon usando el test de t-Student y se empleó el test W de Mann-Whitney cuando las condiciones paramétricas se veían modificadas.

1.6. Resultados obtenidos

1.6.1. Eficacia de M-AmB.

Se realizó un análisis estadístico de Kaplan-Meier con el fin de comprobar que la microemulsión con AmB en una dosis de 1 mg/kg prolongaba la supervivencia de los ratones infectados con *Candida albicans*. Se comparó la supervivencia de un grupo control de ratones infectados sin recibir tratamiento con un grupo de ratones infectados a los que se les administró una dosis de 1 mg/kg de M-AmB 24 horas después de iniciada la infección. Los resultados para ambos grupos aparecen reflejados en la Tabla 68, incluyendo columnas para la estimación de supervivencia con sus errores estándar y los límites de confianza por encima y por debajo del 95%. Los lugares indicados con NA (no un número) son el resultado de la imposibilidad de estimar un error estándar a partir de una supervivencia de valor 0 en un escala de supervivencia logarítmica. La comparación de las curvas de supervivencia se realizó mediante la función `survfit` y los resultados del test de rango logarítmico para el cálculo de la diferencia entre ambos grupos aparece reflejado en la Tabla 69.

Los resultados obtenidos indican que la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa ($p = 4,66 \cdot 10^{-6}$) y muestran que hay una fuerte evidencia para probar que el grupo tratado con la microemulsión presenta una supervivencia mucho mejor que el grupo control.

	Tiempo (días)	Número de muertes	Estimación de supervivencia (ES)	IC de supervivencia inferior al 95%	IC de supervivencia superior al 95%
-Control	3	1	0,9 (0,0949)	0,7320	1,000
	5	5	0,4 (0,1549)	0,1872	0,855
	6	2	0,2 (0,1265)	0,0579	0,691
	8	2	0,0	NA	NA
- M-AmB	10	1	0,9 (0,0949)	0,732	1
	15	1	0,8 (0,1265)	0,587	1

NA: (not a number, no un número) Como resultado de la imposibilidad de estimar un error estándar a partir de una supervivencia de valor 0 en un escala de supervivencia logarítmica.

ES: Error estándar, IC: Intrevalo de confianza.

Tabla 68. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para dos grupos de ratones, uno de ellos un grupo control, y el otro formado por ratones infectados con *C. albicans* a los que se les administró una dosis de M-AmB de 1 mg/kg, 24 horas después de iniciada la infección.

Grupo	Número de muertes	Estimación de la supervivencia media (ES)	Número de muertes observadas (O)	Número de muertes esperadas (E)	$\frac{(O-E)^2}{E}$	$\frac{(O-E)^2}{V}$
Control	10	5,6 (0,452)	10	3,77	10,28	21
M-AmB	2	18,5 (1,012)	2	8,23	4,71	21

$$\chi^2 = 21, \text{ con un grado de libertad, } p = 4,66 \cdot 10^{-6}$$

V: Matriz de varianza estándar multinomial.

Tabla 69. Comparación de las curvas de supervivencia para la estimación de Kaplan-Meier, para un grupo control de 10 ratones infectados con *C. albicans* en comparación con un grupo de 10 ratones infectados tratados con una dosis de 1 mg/kg de M-AmB 24 horas después de iniciada la infección

1.6.2. Comparación de la eficacia de M-AmB y D-AmB en un modelo murino de micosis sistémica.

Los ratones infectados con una dosis de *C. albicans* de $1 \cdot 10^6$ CFU fueron tratados con D-AmB en una dosis de 1 mg/kg o con M-AmB a las dosis de 2 y 3 mg/kg 24, 48 y 72 horas después de iniciada la infección. Fue posible administrar dosis mayores de M-AmB

que de D-AmB sin elevar el riesgo de toxicidad letal, ya que la M-AmB es mucho menos tóxica que la formulación comercial (Moreno, M. A. et al.).

Todos los ratones tratados con D-AmB o M-AmB (2 mg/kg) 24 horas después de iniciada la infección con *C. albicans* sobrevivieron, y a pesar de que no se observaron muertes en ninguno de los grupos, los animales presentaron inicialmente una descoordinación motora durante la primera semana del estudio, recuperándose al cabo de 10 días. Se observó la diferencia de supervivencia existente entre un grupo control inoculado con *C. albicans* y sin recibir tratamiento, y otro grupo de animales también inoculado con *C. albicans* y tratado con la microemulsión sin AmB (2 mg/kg) 24 horas después de ser infectados. En ambos casos los animales murieron en un periodo de 8 días, con lo que se pudo concluir que los excipientes de la microemulsión no afectan a la eficacia del sistema.

Por el contrario los animales tratados con D-AmB 48 horas después de iniciada la infección, presentaron un 25% de mortalidad, en comparación con un 100% de supervivencia que presentaron los ratones a los que se les administró M-AmB a la dosis de 2 mg/kg. El grupo control de animales no tratados murieron en 8 días (Figura 86).

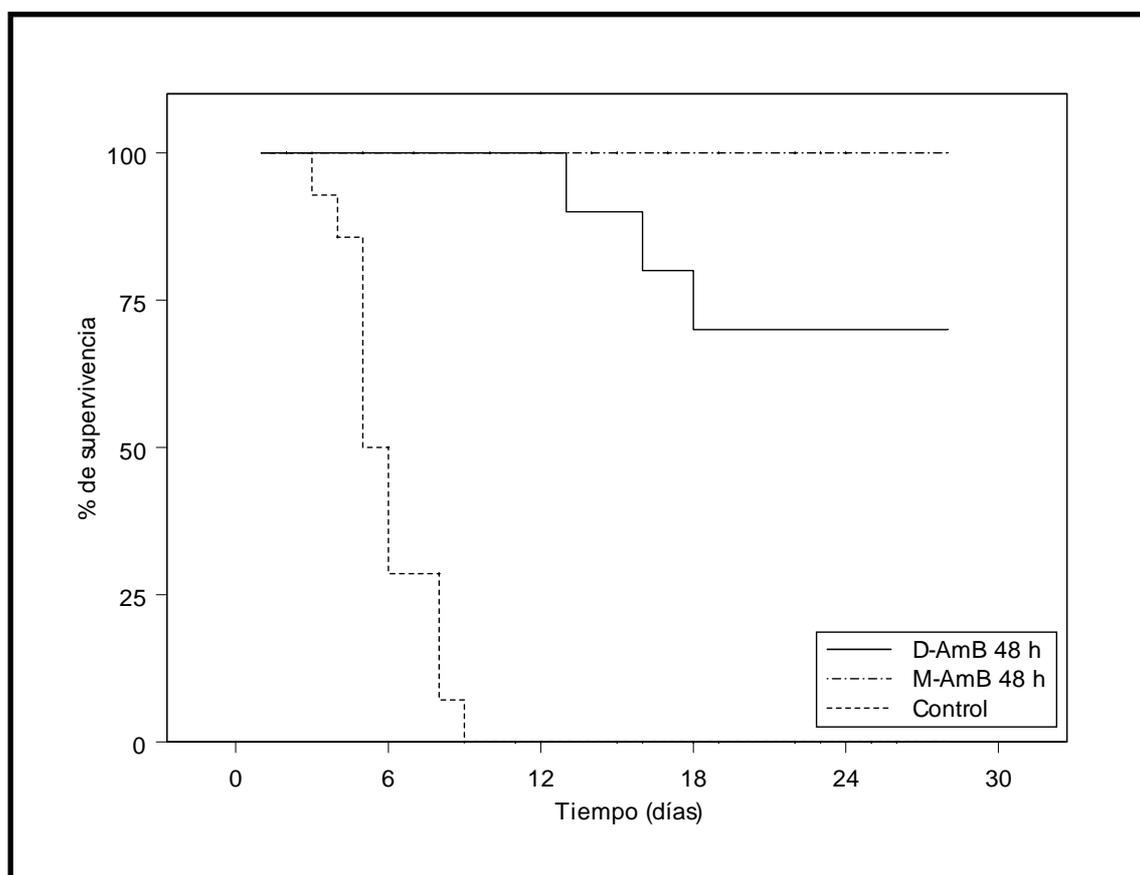


Figura 86. % de supervivencia de ratones inmunocompetentes infectados con *C. albicans* (1.10^6 CFU) tratados 48 horas después de iniciada la infección con una dosis intravenosa de D-AmB (1 mg/kg) o M-AmB (2 mg/kg).

En otro estudio realizado se administraron las formulaciones de D-AmB y M-AmB (2 mg/kg) 72 horas después de iniciada la infección, con el fin de crear un modelo de infección mucho más agresivo y observar el comportamiento de la microemulsión en condiciones de infección más severas. M-AmB presentó una supervivencia del 80% en comparación con el grupo tratado con D-AmB en el cual sólo sobrevivieron el 40% de los ratones. Con el fin de alcanzar una supervivencia del 100%, se administró M-AmB en una dosis de 3 mg/kg en las mismas condiciones indicadas previamente (Figura 87).

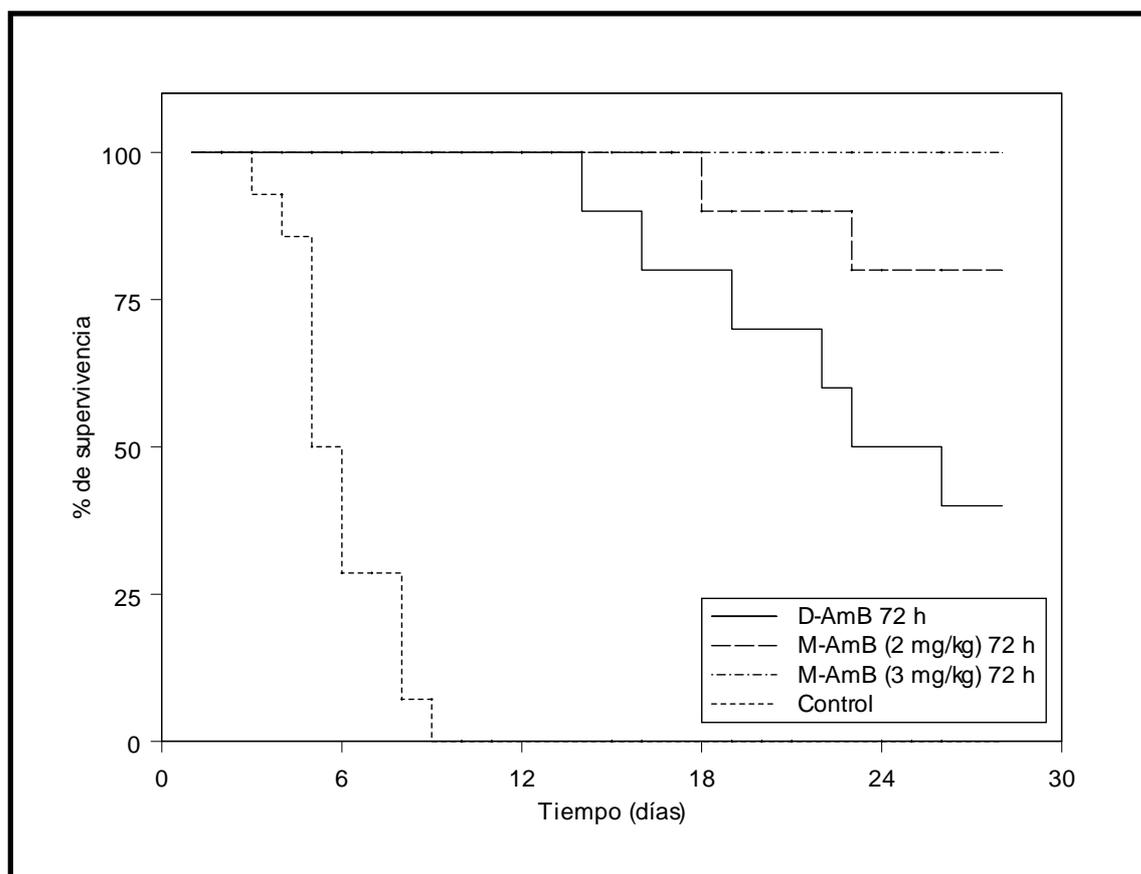


Figura 87. % de supervivencia de ratones inmunocompetentes infectados con *C. albicans* (1.10⁶ CFU) tratados 72 horas después de iniciada la infección con una dosis intravenosa de D-AmB (1 mg/kg) o M-AmB (2 y 3 mg/kg).

Las Figuras 88 y 89 muestran los porcentajes de supervivencia para cada formulación independientemente. Para los grupos tratados con D-AmB, todos los animales sobrevivieron cuando el tratamiento se inició 24 horas después de ser inoculados, pero al incrementar el tiempo entre infección e inicio del tratamiento a 48 y 72 horas, el porcentaje de supervivencia disminuyó a 75% y 40% respectivamente (Figura 88).

Por el contrario, el comportamiento de los animales tratados con M-AmB a las dosis de 2 y 3 mg/kg 24, 48 y 72 horas de iniciada la infección con *C. albicans*, fue muy diferente y mucho más positivo, ya que el porcentaje de supervivencia fue de 100% en todos los casos excepto para los animales tratados con M-AmB a la dosis de 2 mg/kg 72 horas después de iniciada la infección, en los que se observó una supervivencia del 80% (Figura 89).

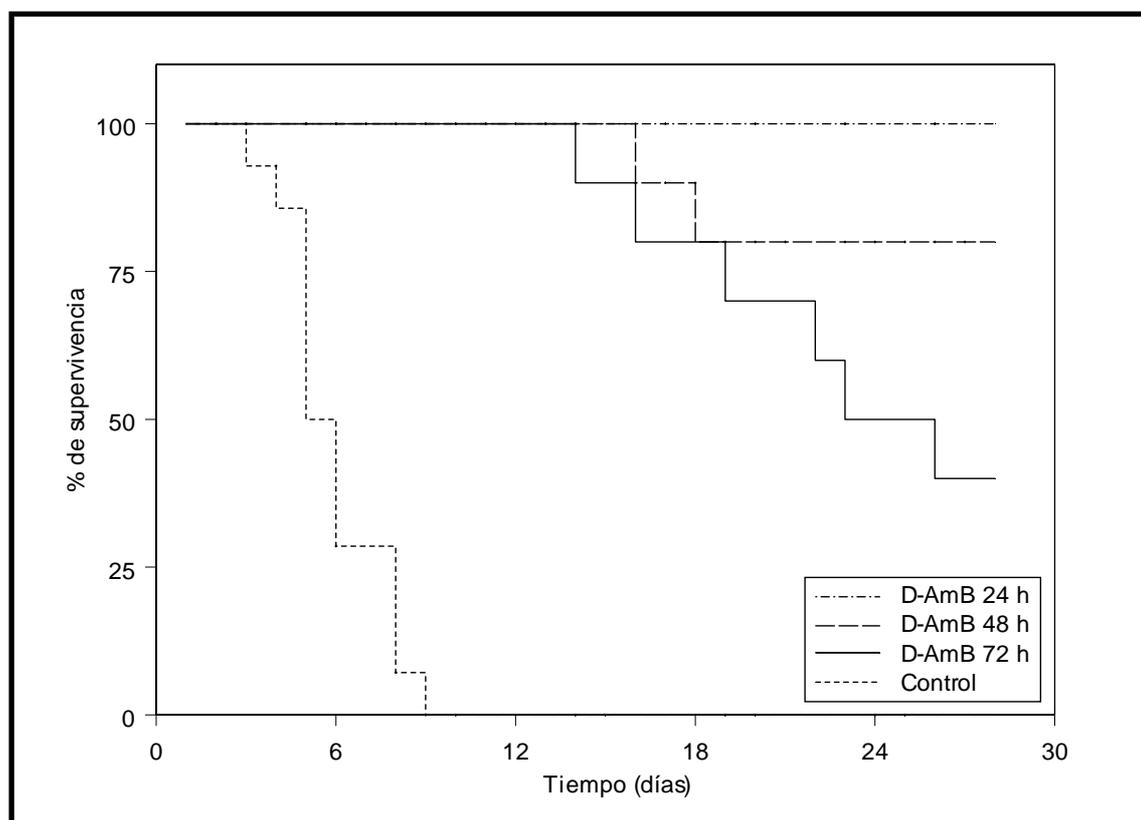


Figura 88. % de supervivencia de ratones inmunocompetentes infectados con *C. albicans* (1.10^6 CFU) tratados 24, 48 y 72 horas después de iniciada la infección con una dosis intravenosa de D-AmB (1 mg/kg).

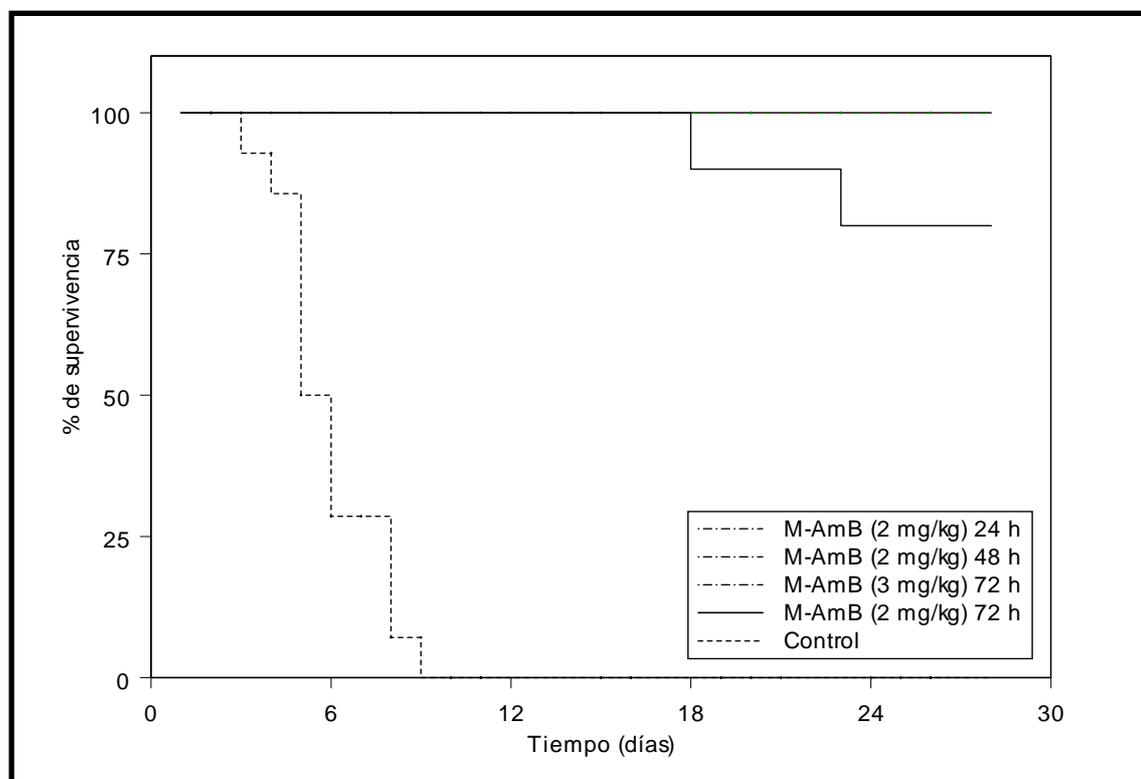


Figura 89. % de supervivencia de ratones inmunocompetentes infectados con *C. albicans* (1.10^6 CFU) tratados 24, 48 y 72 horas después de iniciada la infección con una dosis intravenosa de M-AmB (2 y 3 mg/kg).

La Tabla 70 muestra la carga fúngica en riñones y cerebro de ratones infectados con *C. albicans* y tratados con D-AmB o M-AmB a distintas dosis. Como se puede observar, los animales tratados con D-AmB, 24 horas después de la inoculación, mostraron una carga fúngica en riñones y cerebro aproximadamente 2 veces y media mayor ($4,38 \pm 2,60$ y $2,34 \pm 2,28$, respectivamente) que los animales tratados con M-AmB (2 mg/kg) ($2,49 \pm 2,29$ y $0,83 \pm 1,29$, respectivamente). Cuando se incrementó el tiempo entre inoculación e inicio del tratamiento con D-AmB hasta 48 horas, se observó una mayor disfunción locomotriz de los animales, una mayor carga fúngica en riñones y cerebro así como una disminución de la supervivencia de los animales en comparación con aquellos animales tratados con M-AmB.

En el último estudio de eficacia realizado el tiempo transcurrido entre la infección fúngica sistémica y la administración del fármaco fue de 72 horas. Tiempo suficiente para generar una infección fúngica sistémica elevada y como se puede observar en la Tabla 69, la dosis de D-AmB de 1 mg/kg no fue suficiente para erradicar la infección produciéndose un número muy elevado de fallecimientos en este grupo de animales y una colonización de los riñones de más de 6 CFU (un 70% de los riñones analizados presentaban decoloración). Por el contrario los animales que recibieron una dosis de 3 mg/kg de la microemulsión C sobrevivieron durante 28 días, y el grado de colonización de las cepas de *C. albicans* en cerebro fue nulo y en riñones el \log_{10} CFU fue de $1,10 \pm 1,90$, lo que indica que tras la administración de dicha formulación, la infección se eliminó casi por completo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo ^a (h)	Número de colonias (\log_{10} (media CFU \pm ES))	
			Riñón	Cerebro
D-AmB	1	24	$4,38 \pm 2,60^*$	$2,34 \pm 2,28^*$
M-AmB	2	24	$2,49 \pm 2,29^*$	$0,83 \pm 1,29^*$
D-AmB	1	48	$5,56 \pm 1,05$	$2,98 \pm 0,65$
M-AmB	2	48	$5,50 \pm 1,22$	$1,52 \pm 1,68^*$
D-AmB	1	72	>6	$2,59 \pm 0,54$
M-AmB	2	72	>6	$2,36 \pm 0,31$
M-AmB	3	72	$1,10 \pm 1,90^*$	*

^a: Tiempo de inicio del tratamiento tras la inoculación con *C. albicans*.

*: Todos o algunos de los ratones presentaron un aclaramiento de la infección.

ES: Error estándar.

Tabla 70. Carga fúngica (CFU/órgano) en ratones CR1 inmunocompetentes infectados con *C. albicans* tratados con M-AmB o D-AmB.

Se realizó el test W de Mann-Whitney para comparar las medianas de la carga fúngica en riñones de ratones recibiendo D-AmB o M-AmB (2 mg/kg) 48 horas después de

ser inoculados con *C. albicans*. Este test se realizó combinando dos muestras, clasificando los datos de menor a mayor y comparando los rangos medios de las dos muestras en los datos combinados. Ya que el valor de p obtenido fue de 0,0810, existe una diferencia de las medianas en un nivel de confianza del 95%, lo que significa que existe una diferencia importante entre la carga fúngica de los animales tratados con D-AmB y M-AmB.

También se empleó un test t para comparar las medias de la carga fúngica de los cerebros de ratones infectados con *C. albicans* y tratados con D-AmB y M-AmB (2 mg/kg) 72 horas después de iniciada la infección. El test se construyó para determinar si la diferencia entre las dos medias era igual a 0 frente a la hipótesis alternativa de que la diferencia entre las medias no era igual a 0. Se obtuvo un valor de p de 0,0747, con lo que se puede concluir que existe una diferencia entre los dos grupos, y por lo tanto el grupo de ratones tratados con M-AmB fue capaz de reducir e incluso aclarar en algunos casos la carga fúngica del hongo en riñones y cerebro. Los estudios estadísticos no se pudieron realizar en todos los casos debido a la presencia de aclaramiento de la infección en un gran número de ratones.

A continuación en la Figura 90 se observa con claridad la diferencia de colonización presentada en los riñones de ratones recibiendo D-AmB y M-AmB (2 mg/kg) 72 horas después de iniciada la infección.

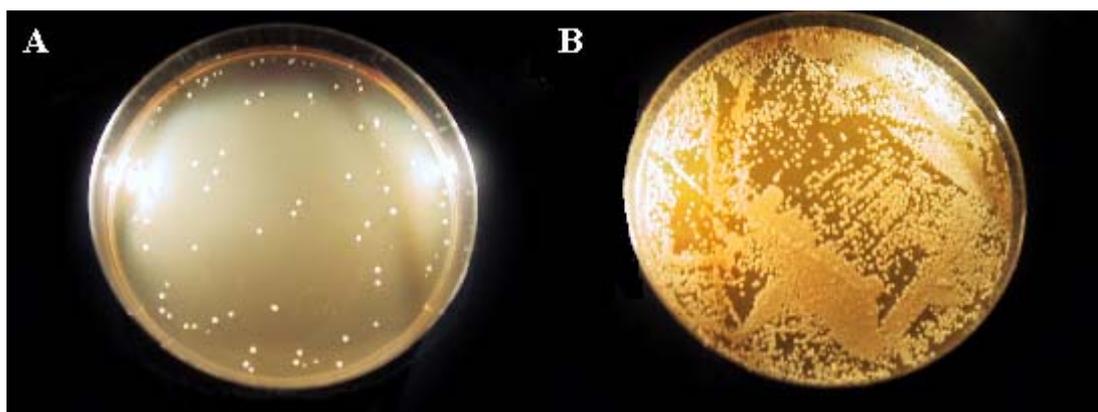


Figura 90. A: Colonias de *C. albicans* provenientes del cultivo de riñones de ratones tratados con una dosis de M-AmB de 3 mg/kg 72 horas después de ser infectados. B: Colonias de *C. albicans* provenientes del cultivo de riñones de ratones infectados con *C. albicans* y tratados con una dosis de D-AmB de 1 mg/kg 72 horas después de ser infectados.

De los resultados obtenidos se puede concluir que los animales infectados con *C. albicans* sin recibir tratamiento murieron al cabo de aproximadamente 8 días, en comparación con los animales tratados con AmB, debido a una colonización sistémica del hongo que provocó un fallo renal y como consiguiente la muerte del animal. Esto se aprecia principalmente por un engrosamiento de la zona abdominal, y cuando la colonización es muy elevada, alcanza a órganos como el cerebro produciendo alteraciones en los movimientos psicomotrices de los animales.

En este estudio se ha demostrado que la M-AmB produce una mayor supervivencia y una reducción en la carga fúngica en riñones y cerebro de los ratones infectados con *C. albicans* en comparación con aquellos tratados con D-AmB.

El diagnóstico definitivo de las infecciones fúngicas en pacientes con leucemia o cáncer tratados con quimioterapia no siempre es posible, debido principalmente a la falta de sensibilidad y especificidad de los métodos de cultivo e histológicos (Thaler, M. et al. 1988). A pesar de que se han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico más rápidos y precisos para las enfermedades fúngicas (Van Burik, J. A. et al. 1998), se obtiene raramente un diagnóstico seguro en los primeros estadios de la infección, y por ello la mayoría de las infecciones fúngicas sistémicas se diagnostican en la autopsia (Bodey, G. et al. 1992). Esta es la razón por la cual se ha incrementado el tiempo entre infección y tratamiento de 24 a 72 horas en ratones inmunocompetentes comprobando que la formulación M-AmB es eficiente contra *C. albicans* incluso en infecciones establecidas. Por el otro lado, los ratones tratados con D-AmB presentaron menores tiempos de supervivencia y mayores cargas fúngicas en los órganos diana siguiendo los mismos regímenes para ambas formulaciones. Y como la M-AmB ha demostrado ser mucho menos tóxica que la formulación D-AmB "in vivo", se pudieron administrar dosis más elevadas sin riesgo de producir una toxicidad letal en los animales de estudio, obteniendo un 100% de supervivencia y reduciendo la carga fúngica en los órganos diana en el modelo de infección más severo (+ 72 horas).

1.6.3. Comparación de la supervivencia de M-AmB y D-AmB en un modelo de candidiasis sistémica 72 horas después de iniciada la inoculación.

Se realizó un análisis estadístico de Kaplan-Meier con el fin de comparar la supervivencia de los ratones tratados con M-AmB en una dosis de 2 mg/kg y los tratados con D-AmB 72 horas después de iniciada la inoculación.

	Tiempo (días)	Número de muertes	Estimación de supervivencia (ES)	IC de supervivencia inferior al 95%	IC de supervivencia superior al 95%
- M-AmB	18	1	0,9 (0,0949)	0,7320	1
	23	1	0,8 (0,1265)	0,587	1
- D-AmB	14	1	0,9 (0,0949)	0,732	1
	16	1	0,8 (0,1265)	0,587	1
	19	1	0,7 (0,1449)	0,467	1
	22	1	0,6 (0,1549)	0,362	0,995
	23	1	0,5 (0,1581)	0,269	0,929
	26	1	0,4 (0,1549)	0,187	0,855

ES: Error estándar, IC: Intrevalo de confianza.

Tabla 71. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para dos grupos de ratones infectados con *C. albicans* a los que se les administró D-AmB o M-AmB (2 mg/kg), 72 horas después de iniciada la infección.

Los resultados para ambos grupos aparecen reflejados en la Tabla 71, incluyendo columnas para la estimación de supervivencia con sus errores estándar y los límites de confianza por encima y por debajo del 95%. La comparación de las curvas de supervivencia se realizó mediante la función `survfit` y los resultados del test de rango logarítmico para el cálculo de la diferencia entre ambos grupos aparece reflejado en la Tabla 72.

Grupo	Número de muertes	Estimación de la supervivencia media (ES)	Número de muertes observadas (O)	Número de muertes esperadas (E)	$\frac{(O-E)^2}{E}$	$\frac{(O-E)^2}{V}$
M-AmB	2	26,5 (1,01)	2	4,49	1,38	3,22
D-AmB	6	23,2 (1,6)	6	3,51	1,76	3,22

$\chi^2 = 3,2$, con un grado de libertad, **p = 0,0727**

V: Matriz de varianza estándar multinomial.

Tabla 72. Comparación de las curvas de supervivencia para la estimación de Kaplan-Meier, para un grupo de 10 ratones infectados con *C. albicans* a los que se les administró D-AmB o M-AmB (2 mg/kg), 72 horas después de iniciada la infección.

Los resultados obtenidos indican que la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa ($p = 0,0727$) y muestran que M-AmB presenta una supervivencia mejor que el grupo tratado con D-AmB.

2. ESTUDIOS DE EFICACIA EN RATONES NEUTROPÉNICOS

2.1. Animales de experimentación

Para realizar este estudio de eficacia se emplearon como animales de experimentación, ratones machos albinos CR1, de un peso comprendido entre 25 y 30 g. Los animales fueron alojados en grupos de 10 en cajas de plástico a una temperatura de 25°C y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, y recibieron comida y bebida sin restricciones durante todo el estudio excepto en el momento en el que se les realizó la administración del fármaco o se les administró la *Candida*. Los animales tuvieron un periodo de adaptación de cuatro días en el animalario previo al estudio de eficacia.

2.2. Inducción de neutropenia

Se indujo la neutropenia en los ratones (< 100 leucocitos polimorfonucleares/ mm^3) mediante la inyección de una dosis de 150 mg/kg vía intraperitoneal de ciclofosfamida 4 días antes y una dosis de 100 mg/kg vía i.p. 1 día antes de iniciar la infección fúngica.

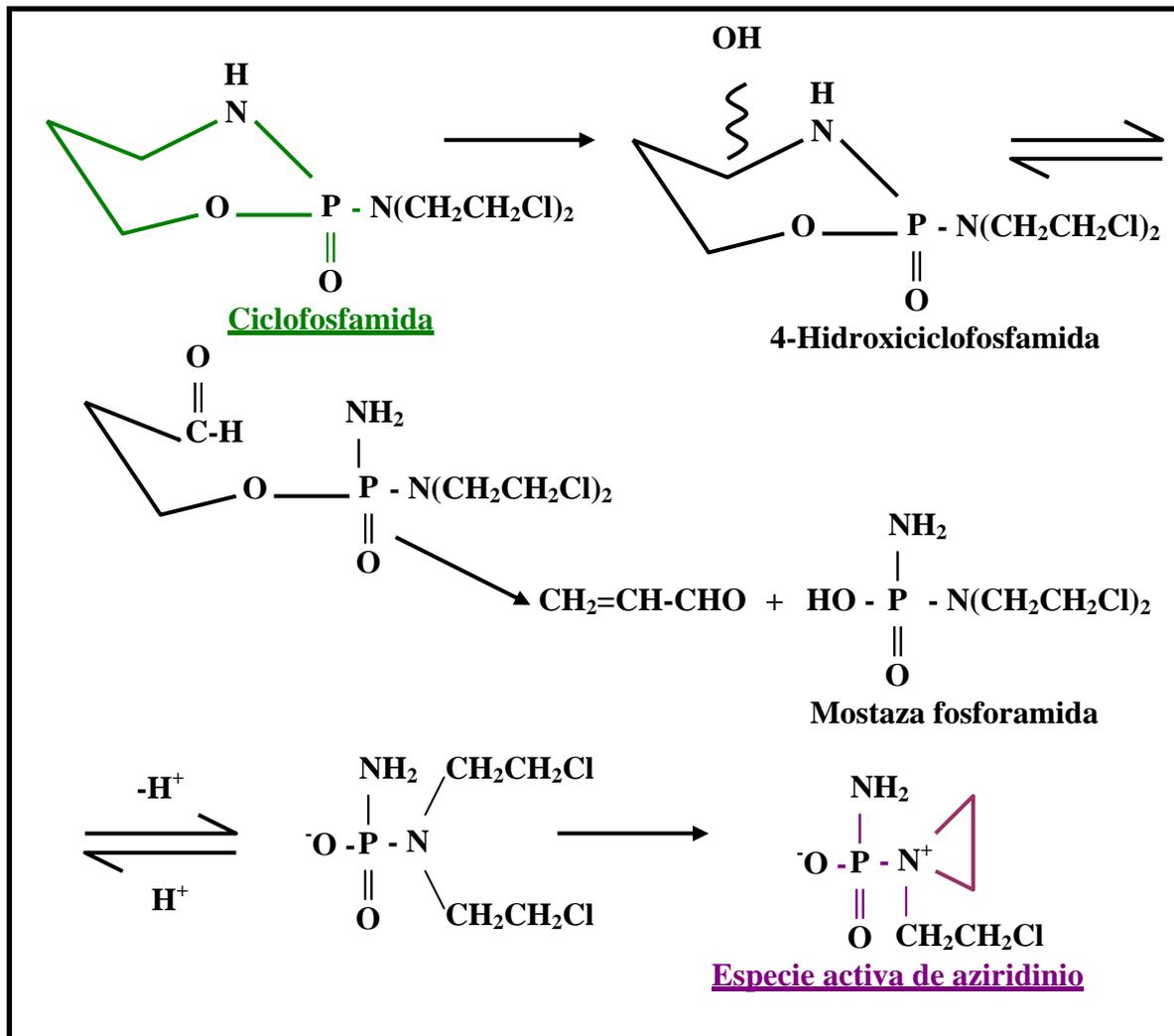


Figura 91. Activación de la ciclofosfamida (Avendaño, C. 1994).

La ciclofosfamida (obtenida en Sigma-Aldrich) es un agente antineoplásico usado para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkins. Posee una marcada actividad inmunosupresora a elevadas dosis, y por ello se empleó en este estudio como fármaco de elección para producir la neutropenia en los animales de laboratorio seleccionados.

La ciclofosfamida se convierte por el citocromo P-450 en el correspondiente 4-hidroxiderivado a través de un intermedio de tipo 4-hidroxiperóxido. Dicho hidroxiderivado posee una estructura de carbinolamina, en equilibrio con la forma aminoaldehído de cadena abierta. La descomposición no enzimática de este último, genera la mostaza fosforamida y acroleína. La fosforamida se cicla al ion aziridinio, que es el agente alquilante activo (Figura 91).

2.3. Modelo de infección con *Candida albicans*

Para el desarrollo de una infección sistémica fúngica en animales de laboratorio se emplearon cepas SC5314 de *Candida albicans*. Para el crecimiento de la *Candida* se cultivó una cepa de *C. albicans* en placas con un medio mínimo de agar (1% de extracto de levadura, 2% de glucosa y 2 % de agar). Transcurridas 24 horas las células fueron recogidas y lavadas dos veces con una solución tampón salina de fosfato (PBS), y posteriormente se diluyeron en PBS hasta alcanzar la concentración deseada de $2 \cdot 10^6$ CFU (unidades formadoras de colonias)/ml.

Para producir la infección fúngica sistémica se les inyectó a los ratones 0,5 ml de la solución de *C. albicans* en la vena lateral de la cola.

2.4. Dosis de fármaco administradas

Las formulaciones empleadas para estos estudios fueron:

- **Microemulsión C (M-AmB).** Con una proporción de Tween 80/lecitina 2:1, un porcentaje de agua del 60 % p/p y una concentración de AmB de 2 mg/ml.
- **Formulación F (D-AmB, Fungizona®).** Formulación comercial de AmB acomplexada con deoxicolato sódico.

La administración intravenosa del fármaco en bolus en forma de microemulsión o la formulación F, ambas en un volumen de 0,1 ml, se realizó por la vena lateral caudal del ratón. Para cada tipo de formulación y cada dosis se emplearon 10 ratones cuya supervivencia fue seguida durante 28 días y el recuento de animales muertos se realizó inmediatamente después de la administración.

La microemulsión C con una concentración de AmB de 2 mg/ml se diluyó en suero glucosado fisiológico al 5% p/v hasta obtener sistemas con la concentración de fármaco adecuada a las dosis a administrar que fueron de 2 y 3 mg/kg, teniendo en cuenta que los animales pesaban aproximadamente 30 g, y el volumen medio de inyección fue de 0,1 ml.

En el caso de la formulación F, la dosis a administrar se preparó según las instrucciones del fabricante, usando agua estéril para la resuspensión seguida de una posterior dilución en suero glucosado fisiológico al 5% p/v, hasta obtener la concentración de fármaco adecuada a la dosis a administrar que fue de 1 mg/kg.

Con el fin de realizar el estudio de eficacia en diferentes condiciones y grados de infección fúngica, la administración de las formulaciones de AmB se realizó a las 2, 6 y 24 horas de iniciada la infección con *C. albicans*.

2.5. Medida de la colonización de las cepas de *Candida albicans* en los órganos diana durante la infección sistémica

El desarrollo de la infección por *C. albicans* se monitorizó mediante el recuento de animales fallecidos, o mediante la evaluación de la carga fúngica (CFU) en los órganos más representativos como son riñones y cerebro. Para ello, a los 28 días de iniciado el tratamiento se tomaron por cada grupo 5 animales que fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se extrajeron los riñones y el cerebro y se introdujeron por separado en una solución de 10 ml de PBS. Se realizó un homogenizado de los órganos mediante el empleo de un agitador Ultra Turrax® T25 Basic (IKA Labortechnik) a 20,000 r.p.m., y posteriormente para el homogenizado con los riñones se realizó una dilución 1/11 en PBS. Una vez obtenidos los homogenizados se realizó una siembra de 100 µl de la dilución y de las suspensiones originales en placas de YED (yeast extract-dextrose) con cloranfenicol y se incubaron a 37°C durante 24-48 h.

2.6. Resultados obtenidos

A continuación aparecen reflejados en la Figura 92 los resultados obtenidos en estos estudios de eficacia realizados en diversas condiciones de infección fúngica.

De los resultados obtenidos se puede concluir que los animales infectados con *C. albicans* mueren al cabo de aproximadamente 7 días, al igual que ha sucedido en los estudios realizados con anterioridad. También se realizó un estudio de supervivencia en aquellos animales a los que se les había tratado únicamente con ciclofosfamida, y se observó que a pesar de producir una neutropenia severa, al no sufrir ninguna infección fúngica o microbiana a nivel sistémico, los animales sobrevivieron durante los 28 días de duración del estudio.

Sin embargo, los animales tratados con ciclofosfamida y con *C. albicans* sobrevivieron 2 días, ya que al producir una inmuodepresión en los animales de estudio, la colonización por parte del hongo fue muchísimo más rápida y produjo la muerte con mucha más aceleración que en los animales inmunocompetentes.

Los ratones inmunodeprimidos infectados con *C. albicans* tratados con M-AmB a las dosis de 2 y 3 mg/kg 2 y 6 horas después de ser inoculados, presentaron una supervivencia del 100%, en comparación con el grupo de animales tratados con D-AmB bajo las mismas condiciones de estudio, 2 y 6 horas después de ser inoculados, presentando una supervivencia del 60% y del 40% respectivamente. Mucho menor fue la supervivencia presentada por los animales inmunodeprimidos tratados con AmB 24 horas después de la inoculación. Para aquellos ratones que recibieron M-AmB la supervivencia fue de 9 días, ya que la infección era muy severa y, en condiciones tan extremas una sola dosis no fue capaz de aclarar la *Candida* del organismo, y los animales tratados con D-AmB murieron en tan sólo 2 días.

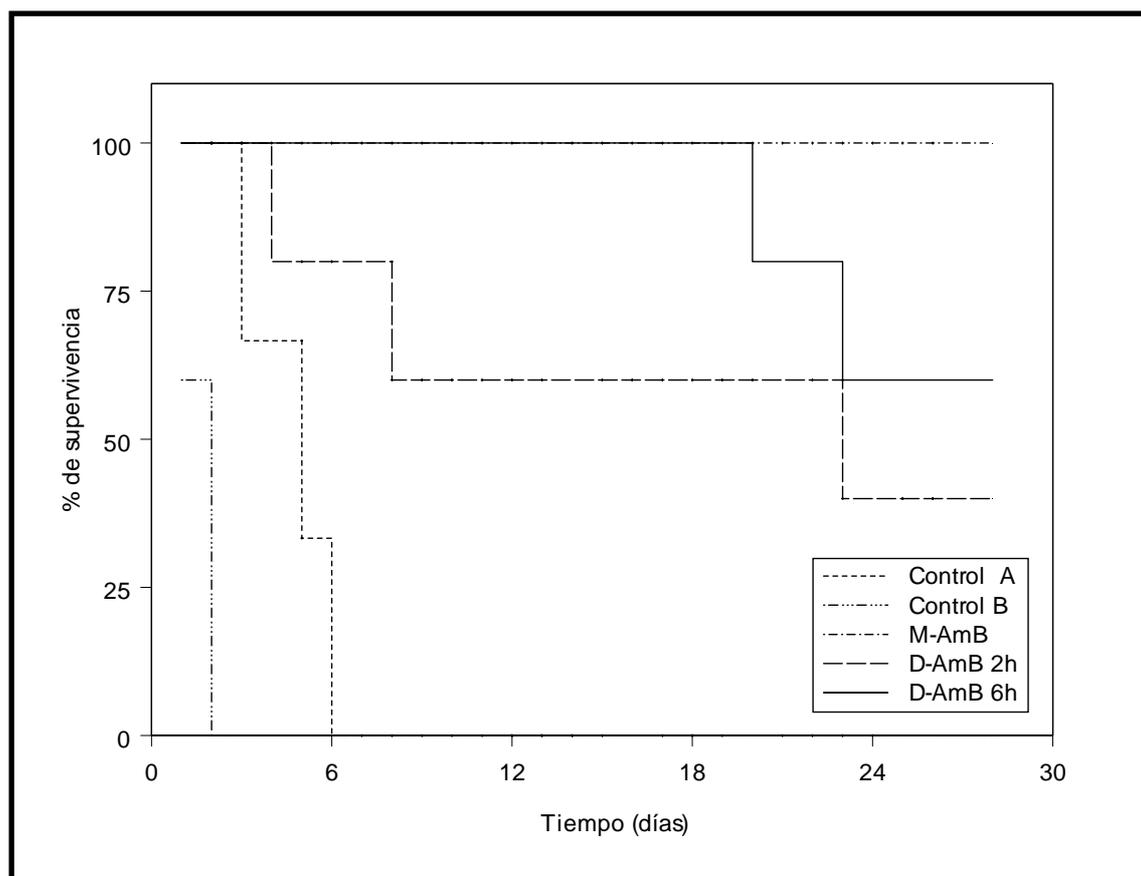


Figura 92. % de supervivencia de ratones inmunodeprimidos infectados con *C. albicans* (1.10^6 CFU) tratados 2 y 6 horas después de iniciada la infección con una dosis intravenosa de D-AmB o M-AmB (2 y 3 mg/kg). Control A es el grupo de ratones no tratados infectados con *C. albicans*, y el Control B es el grupo de ratones neutropénicos infectados con *C. albicans*.

En la Tabla 73 aparece reflejado el número de microorganismos viables en riñones y cerebro de ratones neutropénicos tratados con M-AmB o D-AmB 2 o 6 horas después de ser infectados con *C. albicans*. En todas las condiciones de estudio realizadas, la formulación M-AmB presentó una colonización significativamente mucho menor que la D-AmB, incluso los animales tratados con M-AmB a las dosis de 2 y 3 mg/kg 2 horas después de ser inoculados presentaron un aclaramiento total de la infección en los órganos diana y una recuperación total.

El riesgo de infecciones fúngicas se ha visto notablemente incrementado en los últimos años debido al aumento de pacientes inmunodeprimidos por depresión de la médula ósea, transplantes de órganos o enfermos de SIDA. Y también porque la intensificación del uso de terapias antitumorales ha incrementado la duración y la gravedad de la neutropenia y la deficiencia severa de otros sistemas inmunitarios (De Pauw, B. E. 2001, Garcia, A. et al. 2000). Por esta razón se han realizado estudios de la eficacia de las microemulsiones en ratones neutropénicos. Los resultados han demostrado que M-AmB es capaz de acabar con la infección, mejorando la tasa de supervivencia y reduciendo y en algunos casos aclarando por completo la carga fúngica en riñones y cerebro.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo ^a (h)	Número de colonias (log ₁₀ (media CFU ± ES))	
			Riñón	Cerebro
D-AmB	1	2	1,53 ± 1,45*	1,95 ± 1,41*
M-AmB	2	2	*	*
M-AmB	3	2	*	*
D-AmB	1	6	3,41 ± 0,24	2,09 ± 0,55*
M-AmB	2	6	0,90 ± 1,55*	*
M-AmB	3	6	0,72 ± 1,25*	1,36 ± 1,23*

^a: Tiempo de inicio del tratamiento tras la inoculación con *C. albicans*.

*: Todos o algunos de los ratones presentaron un claramiento de la infección.

ES: Error estándar.

Tabla 73. Carga fúngica (CFU/órgano) en ratones CR1 neutropénicos infectados con *C. albicans* tratados con M-AmB o D-AmB.

A continuación en la Figura 93 se observa con claridad la diferencia de colonización presentada en los riñones de ratones recibiendo D-AmB y M-AmB (2 mg/kg) 6 horas después de iniciada la infección en ratones neutropénicos.

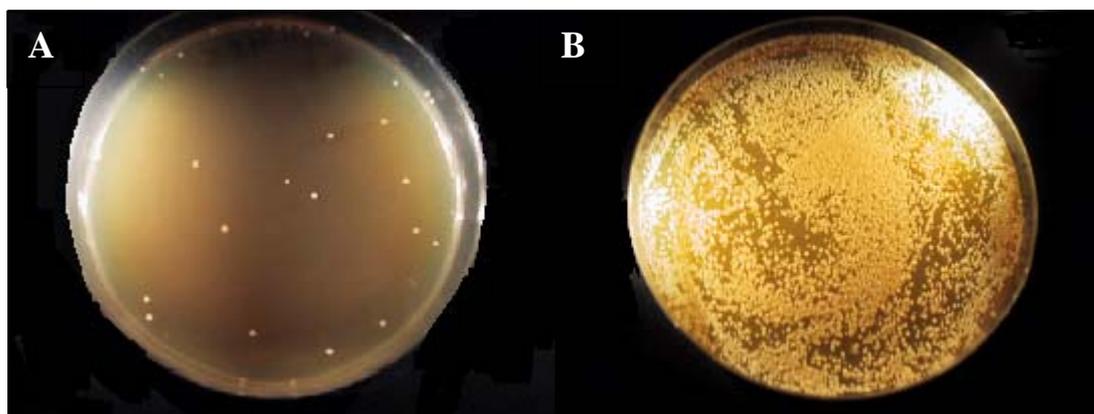


Figura 93. A: Colonias de *C. albicans* provenientes del cultivo de riñones de ratones neutropénicos tratados con una dosis de M-AmB de 2 mg/kg 6 horas después de ser infectados. B: Colonias de *C. albicans* provenientes del cultivo de riñones de ratones infectados con *C. albicans* y tratados con una dosis de D-AmB de 1 mg/kg 6 horas después de ser infectados.

En dos de los 10 ratones neutropénicos infectados con *C. albicans* y tratados con D-AmB 2 horas después de ser inoculados, se observó la presencia de pequeñas manchas rojas por toda la superficie corporal, posiblemente petequias, indicando una reducción en el número de plaquetas, como el resultado de un posible efecto secundario de la D-AmB, por

el contrario, en los animales que recibieron M-AmB no se observó ningún efecto secundario (Figura 94).

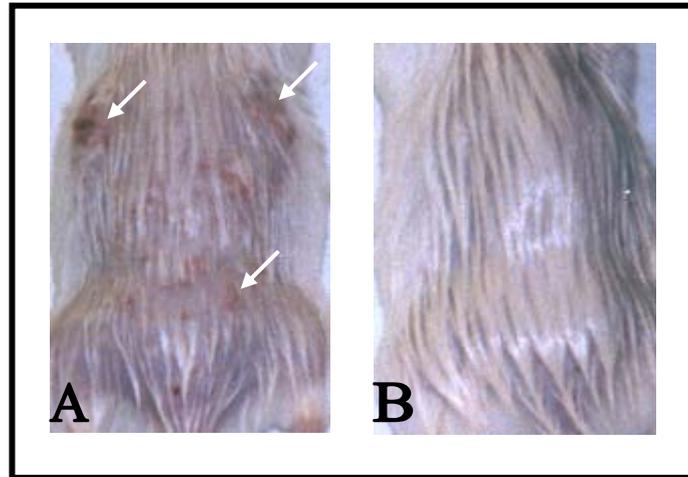


Figura 94. Ratones neutropénicos infectados con *C. albicans* y recibiendo como tratamiento a las 2 horas de iniciada la infección A) D-AmB y B) M-AmB en una dosis de 2 mg/kg. Como se aprecia en la fotografía (flechas blancas), 2 de los 10 ratones infectados y tratados con D-AmB, presentaron en la superficie cutánea lesiones características.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1^a. Se han desarrollado y caracterizado microemulsiones de anfotericina B constituidas por IPM/Brij[®]96V/Lecitina/Agua de las cuales se seleccionaron aquellas con una relación Brij[®] 96V/Lecitina 1,5:1, p/p para posteriores estudios de farmacocinética y toxicidad, ya que presentaron las mejores características respecto a viscosidad y tamaño de gotícula de la fase dispersa, una gran estabilidad al test de centrifugación y a los ciclos de congelación-descongelación, así como una buena estabilidad física y química de las microemulsiones liofilizadas y almacenada durante un periodo de 6 meses a una temperatura de 4°C.
- 2^a. Los estudios de farmacocinética realizados en conejos indican que:
 - a) Existe una diferencia de comportamiento farmacocinético de las microemulsiones A, B y C entre sí y con la formulación comercial Fungizona[®] tras ser administradas en una dosis de 1 mg/kg por vía intravenosa en bolus a conejos.
 - b) A mayores dosis administradas de la microemulsión C en conejos, el valor de los parámetros farmacocinéticos no fue dosis-dependiente.
 - c) Los estudios realizados en conejos tras una administración en perfusión intravenosa de 30 minutos de una dosis de 1 mg/kg durante 4 días cada 24 horas no son concluyentes debido al pequeño tamaño de muestra y a la dificultad del ensayo.
- 3^a. Los estudios de toxicidad aguda en dosis única en ratones de las microemulsiones de AmB constituidas por IPM/Brij[®]96V/Lecitina/Agua, han demostrado un margen de seguridad superior al observado con la formulación comercial Fungizona[®]. El cálculo de la DL₅₀ se realizó por un método propio y por 2 métodos estándar siendo en todos los casos los resultados análogos. De todas las microemulsiones estudiadas, aquella con una toxicidad menor resultó ser la formulación A3, seguida de la microemulsión A1, y para todas ellas la DL₅₀ calculada fue aproximadamente 2 veces mayor que para la formulación comercial
- 4^a. Los estudios de toxicidad subaguda de las microemulsiones de anfotericina B constituidas por IPM/Tween 80/Lecitina/Agua en dosis múltiple en ratones han demostrado que la anfotericina B incorporada en ellas es segura y bien tolerada sin observarse efectos adversos agudos a una dosis de 3 mg/kg cuando se administra a ratones sanos. Una dosis de 0,125 mg de la formulación comercial produce daños tubulares y degeneración glomerular, por el contrario una dosis de 0,375 mg de las microemulsiones no producen lesiones histológicas severas que afecten a la estructura renal.
- 5^a. Los estudios de eficacia mediante la inoculación de *Candida albicans* en ratones inmunocompetentes han demostrado que las microemulsiones de anfotericina B constituidas por IPM/Tween 80/Lecitina/Agua son mucho menos tóxicas que la formulación comercial puesto que se pudieron administrar dosis más elevadas sin riesgo de producir una toxicidad letal en los animales de estudio, obteniendo un 100% de supervivencia y reduciendo la carga fúngica en los órganos diana en el modelo de infección más severo (+ 72 horas).

- 6^a. Los estudios de eficacia mediante la inoculación de *Candida albicans* en ratones neutropénicos han demostrado que las microemulsiones de anfotericina B constituidas por IPM/Tween 80/Lecitina/Agua son capaces de acabar con la infección, mejorando la tasa de supervivencia y reduciendo y en algunos casos aclarando por completo la carga fúngica en riñones y cerebro.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Aboofazeli, R. y Lawrence, M. J. 1993. "Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. I. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol-isopropyl myristate". *Int. J. Pharm.* 93: 161-175.

Aboofazeli, R. y Lawrence, M. J. 1994. "Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. II. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and alcohol: influence of purity of lecithin". *Int. J. Pharm.* 106: 51-61.

Abramowicz, M., Zuccotti, G. y Rizack, M. A. 2001. "The Medical Letter on drugs and therapeutics". The medical letter, Inc. New Rochelle, New York, EEUU.

Adedoyin, A., Bernardo, J. F., Swenson, C. E., Bolsack, L. E., Horwith, G. et al. 1997. "Pharmacokinetic profile of Abelcet (amphotericin B lipid complex injection): combined experience from phase I and phase II studies". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41(10):2201-2208.

Adler-Moore, J. y Proffitt, R. J. 1993. "Development, characterization, efficacy and mode of action of AmBisome, a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B". *J. Liposome. Res.* 3: 429-450.

Adler-Moore, J. y Proffitt, R. J. 1998. In "Long circulating liposomes: Old drugs, new therapeutics"; Woodle, M. C., Storm, G., Eds.; Springer-Verlag: New York, 185-206.

Alvarez-Figueroa, M. J. y Blanco-Mendez, J. 2001. "Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions". *Int. J. Pharm.* 215(1-2): 57-65.

Amantea, M. A., Bowden, R. A., Forrest, A., Working, P. K., Newman, M. S. y Mamelok, R. D. 1995. "Population pharmacokinetics and renal function-sparing effect of amphotericin B colloidal dispersion in patients receiving bone marrow transplants". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39(9): 2042-2047.

Amselem, S., Gabizon, A. y Barenholz, Y. 1990. "Optimization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for clinical use". *J Pharm Sci.* 79(12): 1045-52.

Anaissie, E. J., Mattiuzzi, G. N., Miller, C. B., Noskin, G. A., Gurwith, M. J., Mamelok, R. D. y Pietrelli, L. A. 1998. "Treatment of invasive fungal infections in renally impaired patients with amphotericin B colloidal dispersion". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42(3): 606-611.

Anaissie, E. J., White, M., Uzun, O., Singer, C., Bodey, G. P., Matzke, D. et al. 1995. "Amphotericin B lipid complex (Abelcet) versus amphotericin B (AmB) for treatment of hematogenous and invasive candidiasis: a prospective randomized multicenter trial" (abstract). In: Program and Abstracts on the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, CA. September 17-20. 330.

Andes, D. y van-Ogtrop, M. 1999. "Characterization and quantification of the pharmacodynamics of fluconazole in a neutropenic murine disseminated candidiasis infection model". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43(9): 2116-2120.

Antoniskis, D. y Larsen, R. A. 1990. "Acute, rapidly progressive renal failure with simultaneous use of amphotericin B and pentamidine". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 34(3): 470-472.

Atkinson, A. J. y Bennett, J. E. 1978. "Amphotericin B pharmacokinetics in humans". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 13(2): 271-276.

Attwood, D. y Florence, A. T. 1983. "Surfactant systems. Their Chemistry, Pharmacy and Biology". Chapman and Hall, London.

Attwood, D., Mallon, C. y Taylor, C. J. 1992. "Phase studies on oil-in-water phospholipid microemulsions". *Int. J. Pharm.* 84: R5-R8.

Attwood, D., Mallon, C., Ktistis, G. y Taylor, C. J. 1992. "A study on factors influencing the droplet size in nonionic oil-in-water microemulsions". *Int. J. Pharm.* 88: 417-422.

Avendaño, C. 1994 "Introducción a la Química farmacéutica". McGraw-Hill-Interamericana de España.

Ayestaran, A., Lopez, R. M., Montoro, J. B., Estibalez, A., Pou, L., Julia, A., Lopez, A. y Pascual, B. 1996. "Pharmacokinetics of conventional formulation versus fat emulsion formulation of amphotericin B in a group of patients with neutropenia". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 40(3): 609-612.

Baley, J. E., Meyers, C. y Kliegman, R. M. 1990. "Pharmacokinetic outcome and toxic effects of amphotericin B and 5 fluorocytosine in neonates". *J. Pediatr.* 116: 791-797.

Barchiesi, F., Arzeni, D., Fothergill, A. W., Di-Francesco, L. F., Caselli, F., Rinaldi, M. G. y Scalise, G. 2000. "In vitro activities of the new antifungal triazole SCH 56592 against common and emerging yeast pathogens". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44(1): 226-9.

Baroli, B., Lopez-Quintela, M. A., Delgado-Charro, M. B., Fadda, A. M. y Blanco-Mendez, J. 2000. "Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen". *J. Control. Release.* 69(1): 209-218.

Barthel, D., Zschoernig, O. Lange, K., Lenk, R. y Arnold, K. 1988. "Interaction of electrically charged drug molecules with phospholipid membranes". *Biochim Biophys Acta.* 945(2): 361-6.

Bartner, E., Zinnes, H., Moe, R. A. y Kulesza, J. S. 1958. "Studies on a new solubilized preparation of amphotericin B" *Antibiotics Annual.* 1957-1958. Medical Encyclopedia, Inc., New York, p.p. 53-57.

Beard, H. W., Richert, J. H. y Taylor, R. R. 1960. "The treatment of deep mycotic infections with amphotericin B, with particular emphasis on drug toxicity". *Amer. Rev. Resp. Dis.* 81: 43.

Beggs, W. H. 1986. "Mechanisms of synergistic interactions between amphotericin B and flucytosine" *J. Antimicrob. Chemother.* 17: 402.

Bekersky, I., Fielding, R. M., Dressler, D. E., Lee, J. W., Buell, D. N. y Walsh, T. J. 2002. "Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46(3): 828-33.

Belloca A. 1980. *J. Colloid. Interface Sci.* 74: 311.

Bennett, J. E. 1977. "Amphotericin B binding to serum β -lipoprotein". In: Iwata K (ed) recent advances in medical and veterinary mycology. Proc 6th ISHAM, University Park Press, Baltimore, USA. 107-109.

Benson, J. M. y Nahata, M. C. 1988. "Clinical use of systemic antifungal agents". *Clinical Pharmacy.* 7: 424-438.

Benson, J. M. y Nahata, M. C. 1989. "Pharmacokinetics of amphotericin B in children". *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1989-1993.

Berman, J. y Dietze, R. 1999. "Treatment of visceral leishmaniasis with amphotericin B colloidal dispersion". *Chemotherapy.* 45(Suppl. 1): 54-66.

Berman, L. B., Iovine, G. y Halikis, D. 1963. "The amphotericin kidney". *Clin. Res.* 11: 120.

Bickers, D. R. 1994. "Antifungal therapy: potential interactions with other classes of drugs". *J. Am. Acad. Dermatol.* (3 Pt 2): S87-90.

Bishara, J., Weinberger, M. Y., Lin, A. y Pitlik, S. 2001. "Amphotericin B - not so terrible". *Ann. Pharmacother.* 35:308-310.

Blau, I. W. y Fauser, A. A. 2000. "Review of comparative studies between conventional and liposomal amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients with fever of unknown origin and patients with systemic mycosis". *Mycoses.* 43(9-10): 325-332.

Bodey, G., Bueltmann, B., Duguid, W., Gibbs, D., Hanak, H., Hotchi, M., et al. 1992. "Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey". *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11: 99-109.

Böhme, A. y Hoelzer, D. 1996. "Liposomal amphotericin B as early empiric antimycotic therapy of pneumonia in granulocytopenic patients". *Mycoses.* 39: 419-426.

Boonphong, S., Kittakoop, P., Isaka, M., Pittayakhajonwut, D., Tanticharoen, M. y Thebtaranonth, Y. 2001. "Multiplolides A and B, new antifungal 10-membered lactones from *Xylaria multiplex*". *J. Nat. Prod.* 64(7): 965-7.

Boswell, G. W., Bekersky, I., Buell, D., Hiles, R. y Walsh, T. J. 1998. "Toxicological profile and pharmacokinetics of a unilamellar liposomal vesicle formulation of amphotericin B in rats". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42(2): 263-268.

- Boswell, G. W., Buell, D. y Bekersky, I.** 1998. "AmBisome (liposomal amphotericin B): a comparative review". *Clin. Pharmacol.* 38: 583-592.
- Bowden, R. A., Cays, M., Gooley, T., Mamelok, R. D. y van Burik, J. A.** 1996. "Phase I study of amphotericin B colloidal dispersion for the treatment of invasive fungal infections after marrow trnasplant". *J. Infect. Dis.* 173(5): 1208-1215.
- Brajtburg, J., Elberg, S., Bolard, J., Kobayashi, G. S., Levy, R. A., Ostlund, R. E., Schlessinger, D. y Medoff, G.** 1984. "Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B". *J. Infect. Dis.* 149(6): 986-997.
- Brajtburg, J., Elberg, S., Schwartz, D. R., Vertut-Croquin, A., Schlessinger, D., Kobayashi, G. S. y Medoff, G.** 1985. "Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 27(2): 172-176.
- Brajtburg, J., Powderly, W. y Medoff, G.** 1990. "Amphotericin B: current understanding of mechanism of action". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 34: 183-188.
- Brandriss, M. W., Wolff, S. M., Moores, R. y Stohlman, F.** 1964. "Anemia induced by amphotericin B ". *J. A. M. A.* 189: 663-666.
- Brassinne, C., C. Laduron, A. Coune, J. P. Sculier, C. Hollaert, N. Collette y F. Meunier.** 1987. "High-performance liquid chromatographic determination of amphotericin B in human serum". *J. Chromatogr.* 419: 401-407.
- Brime, B., Moreno, M. A., Frutos, G., Ballesteros, M. P. y Frutos, P.** 2002. "Amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsions: formulation and toxicity evaluation". *J. Pharm Sci.* 91(4): 1178-1185.
- Burgess, J. L. y Birchall, R. B.** 1972. "Nephrotoxicity of amphotericin B, with emphasis on changes in tubular function". *Americ. J. Med.* 53: 77-84.
- Butler, K. M., Rench, M. A. y Baker, C. J.** 1990. "Amphotericin B as a single agent in the treatment of systemic candidiasis in neonates". *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9: 51-56.
- Butler, W. T., Bennett, J. E., Alling, D. W., Wertlake, P. T. et al.** 1964. "Nephrotoxicity of amphotericin B". *Ann. Intern. Med.* 61(2): 175-187.
- Camp, M. J., Wingard, J. R., Gilmore, C. E. et al.** 1998. "Efficacy of low-dose dopamine in preventing amphotericin B nephrotoxicity in bone marrow transplant patients and leukemia patients". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42(12): 3103-3106.
- Campo, C., Anton, E., Morata, C. y Lacruz, J.** 1999. "Amphotericin B associated with severe liver toxicity". *Rev. Clin. Esp.* 199(1): 49.
- Cannon, J. P., Garey, K. W. y Danziger, L. H.** 2001. "A prospective and retrospective analysis of the nephrotoxicity and efficacy of lipid-based amphotericin B formulations". *Pharmacotherapy* 21(9): 1107-1114.
- Carrigan, C. y Hanf-Kristufek, L.** 2001. "Comparison of nephrotoxicity of amphotericin B products". *Clin. Infect. Dis.* 32:990-991.

- Cartwright, R. Y.** 1978. "Use of antibiotics. Antifungals". *Br. Med. J.* 2(6130):108-11.
- Cesaro, S., Calore, E., Messina, C. y Zanesco, L.** 1999. "Allergic reaction to the liposomal component of liposomal amphotericin B". *Support. Care. Cancer.* 7(4): 284-286.
- Chabot, G. G., Pazdur, R., Valeriote, F. A. y Baker, L. H.** 1989. "Pharmacokinetics and toxicity of continuous infusion amphotericin B in cancer patients". *J. Pharm. Sci.* 78: 307-310.
- Changez, M. y Varshney, M.** 2000. "Aerosol-OT microemulsions as transdermal carriers of tetracaine hydrochloride". *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 26(5): 507-512.
- Chariot, J. and Roce, C.** 1968. "Automatic technic of estimating of bilirubin in the bile by the Jendrassik method". *Ann. Biol. Clin. (Paris).* 26(1): 127-132.
- Chen, D. H. y Chen, Y. Y.** 2001. "Synthesis of strontium ferrite ultrafine particles using microemulsion processing". *J. Colloid. Interface. Sci.* 236(1): 41-46.
- Chen, W. y Tan, H. R.** 2000. "Progress on studies of nikkomycin structure and some genes related to nikkomycin biosynthesis". *Sheng. Wu. Gong. Cheng. Xue. Bao.* 16(5): 548-50.
- Ching, M. S., Raymond, R. W., Bury, Mashford, M. L. y Morgan, D. J.** 1983. "Absorption of orally administered amphotericin B lozenges". *Br. J. Clin. Pharmac.* 16: 106-108.
- Chiou, W. L.** 1978. "Critical evaluation of the potential error in pharmacokinetics studies of using linear trapezoidal rule method for calculation of the area under the plasma level-time curve". *J. Pharmacokin. Biopharm.* 6: 539-546.
- Cho, Y. W.** 1992. "Pharmaceutical compositions". U. S. Patent 4, 849, 227, 18 julio.
- Choi, S. Y., Oh, S. G., Bae, S. Y. y Moon, S. K.** 1999. "Effect of short-chain alcohols as cosurfactants on pseudo-ternary phase diagrams containing lecithin". *Korean. J. Chem. Eng.* 16: 377-381.
- Christiansen, K. J., Bernard, E. M., Gold, J. W. y Armstrong, D. A.** 1985. "Distribution and activity of amphotericin B in humans". *J. Infect. Dis.* 152: 1037-1043.
- Clark, J. M., Whitney, R. R., Olsen, S. J., George, R. J., Swerdel, M. R. et al.** 1991. "Amphotericin B lipid complex therapy of experimental fungal infections in mice". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 35: 615-621.
- Clark, R. J., Garson, M. J. y Hooper, J. N.** 2001. "Antifungal alkyl amino alcohols from the tropical marine sponge *Haliclona n. sp.*". *J. Nat. Prod.* 64(12): 1568-71.
- Clemons, K. V. y Stevens, D. A.** 1993. "Therapeutic efficacy of a liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) against murine blastomycosis". *J. Antimicrob. Chemother.* 32: 465-472.
- Clemons, K. V., Sobel, R. A., Williams, P. L. y Stevens, D. A.** 2001. "Comparative toxicities and pharmacokinetics of intrathecal lipid (amphotericin B colloidal Dispersion)

and conventional deoxycholate formulations of amphotericin B in rabbits". 2001. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45(2): 612-615.

Coker, R. J., Viviani, M., Gazzard, B. G., et al. 1993. "Treatment of cryptococcosis with liposomal amphotericin B (AmBisome) in 23 patients with AIDS". *AIDS.* 7: 829-835.

Constantinides, P. P. 1995. "Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects". *Pharm. Res.* 12(11): 1561-1572.

Constantinides, P. P. y Scarlat, J. P. 1997. "Formulation and physical characterisation of water-in-oil microemulsions containing long versus medium chain length glycerides". *Int. J. Pharm.* 158: 57-68.

Constantinides, P. P., Lancaster, C. M., Marcello, J., Chiossone, D. C., Orner, D., Hidalgo, I., Smith, P. L., Sarkahian, A. B., Yiv, S. H. y Owen, A. J. 1995. "Enhanced intestinal absorption of an RGD peptide from water-in-oil microemulsions of different composition and particle size". *J. Control. Rel.* 34: 109-116.

Courchesne, W. E. 2002. "Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300(1): 195-9.

Craven, P. C., Ludden, T. M., Drutz, D. J., Rogers, W., Haegele, K. A. y Skrdlant, H. B. 1979. "Excretion pathways of amphotericin B". *J. Infect. Dis.* 140(3): 329-341.

Dalmora, M. E., Dalmora, S. L. y Oliveira, A. G. 2001. "Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect". *Int. J. Pharm.* 222(1): 45-55.

Daneshmend, T. K. y Warnock, D. W. 1983. "Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs". *Clinical Pharmacokinetics.* 8: 17-42.

Davidson, R. N., di Martino, L., Gradoni, L., et al. 1994. "Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-center trial". *Q. J. Med.* 87: 75-81.

Davis, S. S., Hadgraft, J. y Palin, K. J. 1983. "Medical and pharmaceutical applications of emulsions". In *Encyclopedia of Emulsion technology.* Becher, P., Ed., Marcel Dekker: New York/Basel, Vol 2, 159-238.

D'Cruz, O. J. y Uckun, F. M. 2001. "Lack of adverse effects on fertility of female cd-1 mice exposed to repetitive intravaginal gel-microemulsion formulation of a dual-function anti-HIV agent: aryl phosphate derivate of bromo-methoxy-zidovudine (compound WHI-07)". *J. Appl. Toxicol.* 21(4): 317-322.

De Pauw, B. E. 2001. "Treatment of documented and suspected neutropenia-associated invasive fungal infections". *J- Chemother.* 1(1): 181-192.

Derelanko, M. J. y Hollinger, M. A. 1995. "Handbook of toxicology". CRC Press, Inc., Florida, USA.

Di Martino, L., Davidson, R. N., Giacchino, R., et al. 1997. "Treatment of visceral leishmaniasis in children with liposomal amphotericin B". *B. J. Pediatr.* 131: 271-277.

- Doménech, J., Martínez, J., Plá, J. M., et al.** 1997. "Biofarmacia y farmacocinética". Ed. Síntesis. Madrid.
- Dreher, F., Walde, P., Walther, P. y Wehrli, E.** 1997. "Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport". *J. Control. Rel.* 45: 131-140.
- Drouhet, E. y Dupont B.** 1987. "Evolution of antifungal agents: past, present, and future". *Rev. Infect. Dis.* 9(Suppl 1): S4-S14.
- Dupont, B.** 1999. "Clinical efficacy of amphotericin B colloidal dispersion against infections caused by *Candida* spp". *Chemotherapy.* 45(Suppl. 1): 27-33.
- Echevarría, I., Barturen, C., Renedo, M. J., Trocóniz, I. F. y Dios-Viéitez, M. C.** 2000. "Comparative pharmacokinetics, tissue distributions, and effects on renal function of novel polymeric formulations of amphotericin B and amphotericin B-deoxycholate in rats". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44(4): 898-904.
- Ehrenfreund-Kleinman, T., Azzam, T., Falk, R., Polacheck, I., Golenser, J. y Domb, A. J.** 2002. "Synthesis and characterization of novel water soluble amphotericin B - arabinogalactan conjugates". *Biomaterials.* 23(5): 1327-1335.
- Eicke, H. F.** 1979. "On the cosurfactant concept". *J. Colloid. Interface Sci.* 68: 440-450.
- Ekwall, P.** 1975. "Composition, properties and structures of liquid crystalline phases in systems of amphiphilic compounds". En *Advances in Liquid Crystals.* (Ed. E. G. Brown). New York. Academic Press. 1: 1-142.
- Ellis, M., Spence, D., de Pauw, B., et al.** 1998. "An EORTC international multicentre randomised trial comparing two dosages of liposomal amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis". *Clin. Inf. Dis.* 27: 1406-1412.
- Englehard, D., Marks, M. I. y Good, R. A.** 1986. "Infection in bone marrow transplants recipients". *J. Pediatr.* 108: 335-346.
- Engler-Lohr, M., Anke, T., Hellwig, V. y Steglich, W.** 1999. "Noroudemansin A, a new antifungal antibiotic from *Pterula* species 82168 and three semisynthetic derivatives". *Z. Naturforsch.* 54(3-4): 163-8.
- Erkko, P., Granlund, H., Nuutinen, M. y Reitamo, S.** 1997. "Comparison of cyclosporin A pharmacokinetics of a new microemulsion formulation and standard oral preparation in patients with psoriasis". *Brit. J. Derm.* 136: 82-88.
- Fanos, V. y Cataldi, L.** 2000. "Amphotericin B-induced nephrotoxicity: A review". *J. Chemother.* 12(6): 463-470.
- Farah, N., Laforet, J. P. y Denis, J.** 1994. "Self-microemulsifying drug delivery systems for improving dissolution of drugs: in vitro/in vivo evaluation". *Pharm. Res.* 11: S-202.
- Fielding, R. M., Singer, A. W. y Wang, L. H.** 1992. "Relationship of pharmacokinetics and drug distribution in tissue to increased safety of amphotericin B colloidal dispersion in dogs". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 36: 299-307.

- Fielding, R. M., Smith, P. C., Wang, L. H., Porter, J. y Guo, L. S.** 1991. "Comparative pharmacokinetics of amphotericin B after administration of a novel colloidal delivery system, ABCD, and a conventional formulation to rats". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 35: 1208-1213.
- Fleming, R. V., Kantarijian, H. M., Husni, R., Rolston, K., Lim, J., Raad, I., Pierce, S., Cortes, J. y Estey, E.** 2001. "Comparison of amphotericin B lipid complex (ABLC) vs AmBisome in the treatment of suspected or documented fungal infections in patients with leukemia". *Leuk. Lymphoma.* 40(5-6): 511-520.
- Flórez, J., Armijo, J. A. y Mediavilla, A.** 1997. "Farmacología humana". Ed. Masson, S. A. Barcelona, España, 3ª ed.
- Ford, D. M.** 1994. "Basic mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity". *Pediat. Nephrol.* 8(5): 635-636.
- Fortun, J., Muñoz, P., Montejo, M., Aguado, J., carratla, J. et al.** 1999. In 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy: San Francisco, abst. nº 1644. 574.
- Freire, M., Badaro, F., Avelar, M. E., Luz, K., Nakatani, M. S., Teixeira, R., Martins Netto, E. y Badaro, R.** 1997. "Efficacy and tolerability of liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of visceral leishmaniasis in Brazil". *Braz. J. Infect. Dis.* 1(5): 230-240.
- Friberg, S. E.** 1977. "Microemulsions and micellar solutions". En *Microemulsions. Theory and Practice.* (Ed. L. M. Prince). New York. Academic Press. 133-146.
- Fromtling, R. A.** 1996. "Experimental and clinical pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex". *Drugs Today.* 32: 403-409.
- Fujii, G.** 1996. "Liposomal amphotericin B (amBisome): realization of the drug delivery concept". *Surfactant Sci. Ser.* 62: 491-526.
- Fujukawa, K., Sasaki, H., Pollard, R. B. y Suzuki, F.** 2000. "Laniconazole, a new imidazole antimycotic compound, protects MAIDS mice against encephalitis caused by *Cryptococcus neoformans*". *J. Antimicrob. Chemother.* 46(3): 443-50.
- Gaeta, G. B., Maisto, A., Di Caprio, D., Scalone, A., Pasquale, G., Felaco, F. M., Galante, D. y Gradoni, L.** 2000. "Efficacy of amphotericin B colloidal dispersion in the treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent adult patients". *Scand. J. Infect. Dis.* 32(6): 675-677.
- Gallarate, M., Gasco, M. R., Trotta, M., Chetoni, P. y Saettone, M. F.** 1993. "Preparation and evaluation in vitro of solutions and o/w microemulsions containing levobunolol as ion-pair". *Int. J. Pharm.* 100: 219-225.
- Gallis, H. A., Drew, R. H. y Pickard, W. W.** 1990. "Amphotericin B: 30 years of clinical experience". *Rev. Infect. Dis.* 12: 308-329.

- Gao, Z. G., Choi, H. G., Shin, H. J., Park, K. M., Lim, S. J., Hwang, K. J. y Kim, C. K.** 1998. "Physicochemical characterisation and evaluation of a microemulsion system for oral delivery of cyclosporin A". *Int. J. Pharm.* 161: 75-86.
- García, A., Adler-Moore, J. P. y Proffitt, R. T.** 2000. "Single-dose AmBisome (liposomal amphotericin B) as prophylaxis for murine systemic candidiasis and histoplasmosis". *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(9): 2327-2332.
- García, M. J., Delgado, M. I., Azemar, N. y Solans, C.** 1998. "Solubilización de tetracaína en microemulsiones y nanoemulsiones" Congreso Nacional de la Asociación Española de Docentes de Farmacia Galénica. 163-164.
- García, S., López, J. M., García, M., Adriá, M. A., Barracó, M. y Trillas, E.** 1995. "Modelos reológicos de comportamiento aplicables a fluídos no newtonianos". *An. Real. Acad. Farm.* 61, 211-221.
- Garti, N., Clement, V., Leser, M., Aserin, A. y Fanun, M.** 1999. "Sucrose ester microemulsions". *J. Mol. Liq.* 80: 253.
- Gasco, M. R., Gallarate, M. y Pattarino, F.** 1988. "On the release of prednisone from oil in water microemulsions" *Il farmaco.* 43(10): 325-330.
- Gasco, M. R., Gallarate, M. y Pattarino, F.** 1991. "In-vitro permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions" *Int. J. Pharm.* 69: 193.
- Gasco, M. R., Gallarate, M. y Trotta, M.** 1989. "Microemulsions as topical delivery vehicles: ocular administration of timolol" *J. Pharm. Biom. Anal.* 7: 433-439.
- Gasco, M. R., Morel, S., Tonso, E. y Viano, I.** 1992. "In vivo and in vitro release of insulin from microemulsion" *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.* 19: 502-503.
- Gasco, M. R., Pattarino, F. y Voltani, I.** 1988. "Behaviour of doxorubicine in o/w and w/o microemulsions" *Il farmaco.* 43: 3-12.
- Gerth, K., Washausen, P., Hofle, G., Irschik, H. y reichenbach, H.** 1996. "The jerangolids, A family of new antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties of jerangolid A" *J. Antibiot. (Tokio).* 49(1): 71-5.
- Gold, W., Stout, H. A., Pagano, J. F. y Donovick, R.** 1956. "Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies". In: Welch H, Marti-Ibañez F (eds). *Antibiotics Annual. 1955-1956.* Medical Encyclopedia. Inc, New York, 579-586.
- Goldblum, D., Frueh, B. E., Zimmerli, S. y Bohnke, M.** 2000. "Treatment of postkeratitis fusarium endophthalmitis with amphotericin B lipid complex". *Cornea.* 19(6):853.856.
- Gondal, J. A., Swartz, R. P. y Rahman, A.** 1989. "Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 33: 1544-1548.

Gorman, J. A., Chang, L. P., Clark, J., Gustavson, D. R., Lam, K. S., mamber, S. W., et al. 1996. "Ascosteroside, a new antifungal agent from *Ascotricha amphitricha*. I. Taxonomy, fermentation and biological activities". *J. Antibiot. (Tokio)*. 49(6): 547-52.

Grasela, D., Echevarria, J., Summerill, R., Gonzalez, D., Christafalo, B., Chang, J. et al. 1993. "Pharmacokinetics of amphotericin B following administration as amphotericin B lipid complex (Abelcet) or Fungizone(FZ) in adults with mucocutaneous leishmaniasis" (abstract). In: Program and Abstracts on the 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. New Orleans, LA. October 17-20.382.

Graybill, J. R., Najvar, L. K., Bocanegra, R., Scolpino, A., Mannino, R. J. y Zarif, L. 1999. In 39th Interscience Conference on Antimicrobial agents and Chemotherapy; American Society for Microbiology, Washington, DC: San francisco, USA, CA, abst, n°. J-2009, p.583.

Grit, M. y Crommelin, D. J. 1992 "The effect of aging on the physical stability of liposome dispersions". *Chem Phys Lipids*. 62(2): 113-22.

Grit, M., Zuidam, N. J., Underberg, W. J. M. y Crommelin, D. J. 1993. "Hydrolysis of partially saturated egg phosphatidilcholine in aqueous liposome dispersions and the effect of cholesterol incorporation on hydrolysis kinetics". *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 490-495.

Groll, A. H. y Walsh, T. J. 2001. "Caspofungin: pharmacology, safety and therapeutic potential in superficial and invasive fungal infections". *Expert. Opin. Investig. Drugs*. 10(8): 1545-58.

Groll, A. H., Giri, N., Petraitis, V., Petraitiene, R., Candelario, M., Bacher, J. S., Piscitelli, S. C. y Walsh, T. J. 2000. "Comparative efficacy and distribution of lipid formulations of amphotericin B in experimental *Candida albicans* infection of the central nervous system". *J. Infect. Diseases*. 182: 274-282.

Groll, A., Giri, N., Gonzalez, C., Sein, T., Bacher, J., Piscitelli, S. y Walsh, T. 1997. In 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Canada, abst, n°. A-90.

Guo, L. S. 2001. "Amphotericin B colloidal dispersion: an improved antifungal therapy". *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 47(2-3): 149-163.

Guo, L. S. y Working, P.K. 1993. "Complexes of amphotericin B and cholesteryl sulfate". *J. Liposome Res.* 3: 473-490.

Gupte, R. D. 1968. "A rapid an accurate colorimetric microtechnic for the determination of total cholesterol in serum, whole blood or plasma, using Liebermann-Burchard reaction and without digitonin precipitation". *Indian. J. med. Res.* 56(12): 1771-1776.

Gurwith, M., Mamelok, R., Pietrelli, L. y Du Mond, C. 1999. "Renal sparing by amphotericin B colloidal dispersion: clinical experience in 572 patients". *Chemotherapy*. 45(Suppl. 1): 39-47.

Hanaoka, T., Hayashi, H., Tago, T., Kishida, M. y Wakabayashi, K. 2001. "In situ immobilization of ultrafine particles synthesized in a water/oil microemulsion". *J. Colloid Interface. Sci.* 235(2): 235-240.

Hasse, A. y Keipert, S. 1997. "Development and characterisation of microemulsions for ocular application". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43: 179-183.

Hausen, B., Ikonen, T., Briffa, N., Berry, G. J., Christians, U., Robbins, R. C., Hook, L., Serkova, N., et al. 2000. "Combined immunosuppression with cyclosporine (Neoral) and SDZ RAD in non-human primate lung transplantation: systematic pharmacokinetic-based trials to improve efficacy and tolerability". *Transplantation.* 69: 76-86.

Hein, S. M., Gloer, J. B., Koster, B. y Malloch, D. 1998. "Arugosin F: a new antifungal metabolite from the coprophilous fungus *Ascodesmis sphaerospora*". *J. Nat. Prod.* 61(12): 1566-7.

Hein, S. M., Gloer, J. B., Koster, B. y Malloch, D. 2001. "Bombardolides: new antifungal and antibacterial gamma-lactones from the coprophilous fungus *Bombardioidea anartia*". *J. Nat. Prod.* 64(6): 809-12.

Heinemann, V., Bosse, D., Jehn, U., Debus, A., Wachholz, K., Forst, H. y Wilmanns, W. 1997. "Enhanced pulmonary accumulation of liposomal amphotericin B (AmBisome) in acute liver transplant failure". *J. Antimicrob. Chemother.* 40(2): 295-297.

Heinemann, V., Bosse, D., Jehn, U., Kahny, B., Wachholz, K., Debus, A., Scholz, P., Kolb, H. J. y Wilmanns, W. 1997. "Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (Ambisome) in critically ill patients". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41(6): 1275-1280.

Heinemann, V., Pyka, S., Bosse, D., et al. 1995. "Liposomal amphotericin B (AmBisome): clinical safety and efficacy". *Onkologie.* 18(Suppl. 2): 198.

Herbrecht, R. 1997. "Safety of amphotericin B colloidal dispersion". *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16(1): 74-80.

Herbrecht, R., Auvrignon, A., Andres, E., Guillemain, R., Suc, A., Eyer, D., Paillet, C., Letscher-Bru, V., Leverger, G. y Schaison, G. 2001. "Efficacy of amphotericin B lipid complex in the treatment of invasive fungal infections in immunosuppressed paediatric patients". *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(2): 77-82.

Herbrecht, R., Letscher, V., Andres, E. y Cavalier, A. 1999. "Safety and efficacy of amphotericin B colloidal dispersion. An overview". *Chemotherapy.* 45(Suppl 1): 67-76.

Herbrecht, R., Letscher-Bru, V., Bowden, R. A., Kusne, S., Anaissie, E. J., Graybill, J. R., Noskin, G. A., et al. 2001. "Treatment of 21 cases of invasive mucormycosis with amphotericin B colloidal dispersion". *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(7): 460-466.

Herreros, E., Almela, M. J., Lozano, S., Gomez de las Heras, F. y Gargallo-Viola, D. 2001. "Antifungal activities and cytotoxicity studies of six new azasordarins". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45(11): 3132-9.

Hiddemann, W., Maschmeyer, G., Link, H. M., Helmering, M. y Adam, D. 1997. "Therapy of infections in patients with acute leukemia". *Med. Klin.* 92(7): 406-409.

Hiemenz, J. W. y Walsh, T. J. 1996. "Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions". *Clin. Infect. Dis.* 22(Suppl 2): S133-S144.

- Hiemenz, J. W., Lister, J., Anaissie, E. J., White, M. H., Dinubile, M., Silber, J. et al.** 1995. "Emergency-use amphotericin B lipid complex (ABLC) in the treatment of patients with aspergillosis: historical control comparison with amphotericin B" (abstract). *Blood*. 86(Suppl. 1): 849^a.
- Hill, G. J. H., Butler, W. T., Wertlake, P. T. y Utz, J. P.** 1962. "The renal histopathology in amphotericin B toxicity in man and the dog". *Clin. Res.* 10: 249.
- Ho, H., Chen, L., Chiang, H., Spur, B., Wong, P. y Sheu, M.** 1998. "The percutaneous delivery of prostaglandine E 1 carried by microemulsion systems". *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 25, Controlled release Society, Inc., 579-580.
- Ho, H., Hsiao, C. y Sheu, M.** 1996. "Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs". *J. Pharm. Sci.* 85(2): 139-142.
- Ho, H., Huang, M. C., Chen, L. C., Hsia, A., Chen, H. S., Chiang, H., Spur, B., Wong, P. y Sheu, M.** 1998. "The percutaneous delivery of prostaglandine E 1 and its alkyl esters by microemulsions". *Chin. Pharm. J.* 50: 257-266.
- Hoar, T. P. y Schulman, J. H.** 1943. "Transparent water-in-oil dispersions: Oleopathic hydromicelle". *Nature*. 152: 102.
- Hoffman, H. L. y Rathbun, R. C.** 2002. "Review of the safety and efficacy of voriconazol". *Expert. Opin. Investig. Drugs*. 11(3): 409-29.
- Hoffman, H. L., Ernst, E. J. y Klepser, M. E.** 2000. "Novel triazole antifungal agents". *Expert. Opin. Investig. Drugs*. 9(3): 593-605.
- Hoitsma, J. A., Wetzels, J. F. M. y Koene, R.** 1991. "Drug-induced nephrotoxicity. Aetiology, clinical features and management". *Drug Safety*. 6(2): 131-147.
- Holt, D. W., Mueller, E. A., Kovarik, J. M., van Bree, J. B. y Kutz, K.** 1994. "The pharmacokinetics of Sandimmune Neoral: A new oral formulation of cyclosporine" *Transplant. Proc.* 26: 2935-2939.
- Holtzel, A., Kempter, C., Metzger, J. W., Jung, G., Groth, I., Fritz, T. y Fiedler, H. P.** 1998. "Spirofungin, a new antifungal antibiotic from *Streptomyces violaceusniger* Tu 4113". *J. Antibiot. (Tokio)*. 51(8): 699-707.
- Hori, K., Sakaguchi, A., Kudoh, M., Ishida, K., Aoyama, Y. y Yoshida, Y.** 2000. "Structure-activity relationships of a new antifungal imidazole, AFK-108, and related compounds". *Chem. Pharm. Bull. (Tokio)*. 48(1): 60-4.
- Hosoe, T., Okada, H., Itabashi, T., Nozawana, K., Okada, K., Takaki, G. M., Fukushima, K., Miyaji, M. y Kawai, K.** 2000. "A new pentanorlanostane derivate, cladosporide A, as a characteristic antifungal agent against *Aspergillus fumigatus*, isolated from *Cladosporium* sp.". *Chem. Pharm. Bull. (Tokio)*. 48(10): 1422-6.
- Houin, G. et al.** 1990. "Pharmacocinétique". Ed. Ellipses. Association des Enseignants de Pharmacologie des U. F. R. de Pharmacie. Paris.

- Hughes, C. E., Harris, C. y Moody, J. A.** 1984a. "In vitro activities of amphotericin B in combination with four antifungal agents and rifampin against *Aspergillus* spp". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 25: 560.
- Hughes, C. E., Harris, C., Peterson, L. R. y Gerding, D. N.** 1984b. "Enhancement of the in vitro activity of amphotericin B against *Aspergillus* spp by tetracycline analogs". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 26: 840.
- Hutchaleelaha, A., Chow, H. y Mayersohn, M.** 1997. "Comparative pharmacokinetics and interspecies scaling of amphotericin B in several mammalian species". *J. Pharm. Pharmacol.* 49: 178-183.
- Igarashi, Y., Kuwamori, Y., Takagi, K., Ando, T., Fudou, R., Furumai, T. y Oki, T.** 2000. "Xanthoepocin, a new antibiotic from *Penicillium simplicissimum* IFO5762". *J. Antibiot. (Tokio).* 53(9): 928-33.
- Jakobi, M., Winkelmann, G., Kaiser, D., Kempler, C., Jung, G., Berg, G. y Bahl, H.** 1996. "Maltophilin, a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089". *J. Antibiot. (Tokio).* 49(11): 1101-4.
- Janknegt, R., de Marie, S., Bakker-Woudenberg, I. y Crommelin, D.** 1992. "Liposomal and lipid formulations of amphotericin B" *Clin. Pharmacokinet.* 23(4): 279-291.
- Janoff A. S., Perkins, W. R. y Saletan, S. L.** 1993. "Amphotericin B lipid complex (ABLC): a molecular rationale for the attenuation of amphotericin B related toxicities". *J. Lipos. Res.* 3: 451-471.
- Janoff, A. S., Boni, L. T., Popescu, M. C., Minchey, S. R., Cullis, P. R. y Madden, T. D.** 1988. "Unusual lipid structures selectively reduce the toxicity of amphotericin B". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85: 6122-6126.
- Janoff, A. S., Perkins, W. R., Saletan, S. L. y Swenson, C. E.** 1993. *J. Liposome Res.* 3: 451-472.
- Joly, V., Farinotti, R., Saint-Julien, L., Chéron, M., Carbon C. y Yeni, P.** 1994. "In vitro renal toxicity and in vivo therapeutic efficacy in experimental murine cryptococcosis of amphotericin B (Fungizone) associated with Intralipid". *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:177-183.
- Juliano, R. L., Grant, C. W., Barber, K. R. y Kalp, M. A.** 1987. "Mechanism of the selective toxicity of amphotericin B incorporated into liposomes". *Mol. Pharmacol.* 31: 1-11.
- Juster-Reicher, A., Leibovitz, E., Linder, N., Amitay, M., Flidel-Rimon, O., Even-Tov, S., Mogilner, B. y Barzilai, A.** 2000. "Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of neonatal candidiasis in very low birth weight infants". *Infection.* 28(4):223-226.
- Kaloyanides, G. J.** 1994. "Antibiotic-related nephrotoxicity". *Nephrol. Dial. Transpl. Supplement* 4: 130-134.

- Kamai, Y., Harasaki, T., Fukuoka, T., Ohya, S., Uchida, K., Yamaguchi, H. y Kuwahara, S.** 2002. "In vitro and in vivo activities of CS-758 (R-120758), a new triazole antifungal agent". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46(2): 367-70.
- Kan, V., Bennett, J., Amantea, M., Smolskis, M., Grasela, D. et al.** 1991. "Comparative safety and pharmacokinetic study of amphotericin B lipid complex and amphotericin B deoxycholate in healthy young male volunteers". *J. Infect. Dis.* 164: 418-425.
- Kantaria, S., Rees, G. D. y Lawrence, M. J.** 1999. "Gelatin-stabilised microemulsion-based organogels: rheology and application in iontophoretic transdermal drug delivery". *J. Control. Rel.* 60: 355-365.
- Kappe, R.** 2001. "Antifungal activity of the new azole UK-109496 (voriconazole): addition and clarification". *Mycoses.* 44(9-10):432.
- Kelsey, S. M., Goldman, J. M., McCann, S., et al.** 1999. "Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the prophylaxis of fungal infections in neutropenic patients: a randomised double-blind, placebo-controlled study". *Bone. Marrow. Trans.* 23: 163-168.
- Kemken, J., Ziegler, A. y Müller, B. W.** 1991. "Pharmacodynamic effects of transdermal bupranolol and timolol in vivo: comparison of microemulsions and matrix patches as vehicle". *Meth. Exp. Clin. Pharmacol.* 13: 361-365.
- Khoo, S. M., Humberstone, A. J., Porter, C. J. H., Edwards, G. A. y Charman, W. N.** 1998. "Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine". *Int. J. Pharm.* 167: 155-164.
- Kim, C. K., Cho, Y. J. y Gao, Z. G.** 2001. "Preparation and evaluation of biphenyl dimethyl dicarboxylate microemulsions for oral delivery". *J. Control. Release.* 70(1-2): 149-155.
- Kim, E. y Goldberg, M.** 1969. "Serum cholesterol assay using a stable Liebermann-Burchard reagent". *Clin. Chem.* 15(12): 1171-1179.
- Kim, H. J., Yoon, K. A., Hahn, M., Park, E. S. y Chi, S. C.** 2000. "Preparation and in vitro evaluation of self-emulsifying drug delivery systems containing idebenone". *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 26(5): 523-529.
- Kim, J. C. and Kim, J. D.** 2001. "Preparation by spray drying of amphotericin B-phospholipid composite particles and their anticellular activity". *Drug. Deliv.* 8(3): 143-147.
- Klepser, M. E., Wolfe, E. J., Jones, R. N., Nightingale, C. H. y Pfaller, M. A.** 1997. "Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41: 1392-1395.
- Kotler-Brajtburg, J., Medoff, G., Kobayashi, G. S., Schlessinger, D. y Atallah, A.** 1977. "Sensitivity to amphotericin B and the cholesterol: Phospholipid molar ratios of 3T3, L, BHK and HeLa cells". *Biochem. Pharmacol.* 26: 705-710.

- Kotler-Brajtburg, J., Price, H. D., Medoff, G., Schlessinger, D. y Kobayashi, G. S.** 1974. "Molecular basis for the selective toxicity of amphotericin B for yeast and filipin for animal cells". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 5: 377-382.
- Kreft, B., de Wit, C., Marre, R. y Sack, K.** 1991. "Experimental studies on the nephrotoxicity of amphotericin B in rats". *J. Antimicrob. Chemother.* 28(2): 271-281.
- Kreilgaard, M.** 2001. "Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by in vivo microdialysis". *Pharm. Res.* 18(3): 367-373.
- Kreilgaard, M., Kemme, M.J., Burggraaf, J., Schoemaker, R. C. y Cohen, A. F.** 2001. "Influence of a microemulsion vehicle on cutaneous bioequivalence of a lipophilic model drug assessed by microdialysis and pharmacodynamics". *Pharm. Res.* 18(5): 593-599.
- Kreilgaard, M., Pedersen, E. J. y Jaroszewski, J. W.** 2000. "NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems". *J. Control. Rel.* 69(3): 421-433.
- Kriwet, K. y Muller-Goymann, C. C.** 1995. "Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum". *Int. J. Pharm.* 125: 231-242.
- Krüger, W., Stockschräder, M., Rüssmann, B., et al.** 1995. "Experience with liposomal amphotericin B in 60 patients undergoing high-dose therapy and bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation". *Br. J. Haematol.* 91: 684-690.
- Ktistis, G.** 1990. "A viscosity study on oil-in-water microemulsions". 1990. *Int. J. Pharm.* 61: 213-218.
- Ktistis, G.** 1997. "Effect of polysorbate 80 and sorbitol concentration on in vitro release of indomethacin from microemulsions". *J. Disp. Sci. Technol.* 18: 49-61.
- Ktistis, G. y Niopas, I.** 1998. "A study on the in-vitro percutaneous absorption of propranolol from disperse systems". *J. Pharm. Pharmacol.* 50: 413-418.
- Kucuk, O., Lis, L. J., Dey, T., Mata, R., Westerman, M. P. et al.** 1992. "The effects of cholesterol oxidation products in sickle and normal red blood cell membranes". *Biochim Biophys Acta.* 1103(2): 296-302.
- Kwan, C. N., Medoff, G., Kobayashi, G. S., Schlessinger, D. y Raskas, H. J.** 1972. "Potentiation of the antifungal effects of antibiotics by amphotericin B". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2: 61-65.
- Kwong, E. H., Ramaswamy, M., Bauer, E. A., Hartsel, S. C. y Wasan, K. M.** 2001. "Heat treatment of amphotericin B modifies its serum pharmacokinetics, tissue distribution, and renal toxicity following administration of a single intravenous dose to rabbits". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45(7): 2060-2063.
- Lampen, J. O., Morgan, E. R., Slocum, A. y Arnow P.** 1959. "Adsorption of nystatin by micro-organisms". *J. Bacteriol.* 78: 282-289.

Lang, J., Vigo-Pelfrey, C. y Martin, F.1990. "Liposomes composed of partially hydrogenated egg phosphatidylcholines: fatty acid composition, thermal phase behavior and oxidative stability". *Chem Phys Lipids*. 53(1): 91-101.

Lavasanifar, A., Samuel, J., Sattari, S. y Kwon, G. S. 2002. "Block copolymer micelles for the encapsulation and delivery of amphotericin B". *Pharm. Res*. 19(4): 418-422.

Leblanc, P., Aiache, J., Besner, J., Buri, P., Lesne, M. et al. 1997. "Traité de biopharmacie et pharmacocinétique". 3^a ed. Les Presses de l'Université de Montreal. Ed. Vigot. Montreal.

Lee, J. W., Amantea, M. A., Francis, P. A., Navarro, E. E., Bacher, J., Pizzo, P. A. y Walsh, T. J. 1994. "Pharmacokinetics and safety of a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in rabbits". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 38(4): 713-718.

Lee, M. H., Oh, S. G. y Yi, S. C. 2000. "Preparation of Eu-doped Y (2) o (3) luminescent nanoparticles in nonionic reverse microemulsions". *J. Colloid Interface. Sci.* 226(1): 65-70.

Leenders, A. C. A. P., Daenen, S., Jansen, R. L. H., et al. 1998. "Liposomal amphotericin B deoxycholate in the treatment of documented and suspected neutropenic associated invasive infections". *Br. J. Haematol.* 103: 205-212.

Leenders, A. C. A. P., Reiss, P., Portegies, P., et al. 1997. "Liposomal amphotericin B (AmBisome) compared with amphotericin B both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis". *AIDS*. 11: 1463-1471.

Lehmann, L., Keipert, S. y Gloor, M. 2001. "Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52(2): 129-136.

Lin, A. C., Goldwasser, E., Bernard, E. M. y Chapman, S. W. 1990. "Amphotericin B blunts erythropoietin response to anemia". *J. Infect. Dis.* 161(2): 348-351.

Linden, P., Williams, P. y Chan, K. M. 2000. "Efficacy and safety of amphotericin B lipid complex injection (ABLIC) in solid-organ transplant recipients with invasive fungal infections". *Clin. Transplant.* 14(4 Pt 1): 329-339.

Lister, J. 1994. "Amphotericin B lipid complex in the management of serious systemic mycoses in patients intolerant to amphotericin B therapy (abstract)". *Blood*. 84(Suppl.):306^a.

LoNostro, P., Choi, S. M., Ku, C. Y. y Chen, S. H. 1999. "Fluorinated microemulsions: A study of the phase behaviour and structure". *J. Phys. Chem. B*. 103(25): 5347.

Lopez-Berestein, G., Hopfer, R. L., Mehta, R., Hersh, E. M. y Juliano, R. L. 1984. "Liposome-encapsulated amphotericin B for the treatment of disseminated candidiasis in neutropenic mice". *J. Infect. Dis.* 150: 278-283.

Lorf, T., Braun, F., Ruchel, R., Muller, A., Sattler, B. y Ringe, B. 1999. "Systemic mycoses during prophylactical use of liposomal amphotericin B (AmBisome) after liver transplantation". *Mycoses*. 42(1-2): 47-53.

- Lozano-Chiu, M., Arikan, S., Martin-Diez, F. M., Paetznick, V. et al.** 1998. In 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; American Society for Microbiology, Washington, D. C.: San Diego, C. A. 455.
- Ludden, T. M., Beal, S. L. y Sheiner, L. B.** 1994. "Comparison of the Akaike Information Criterion, the Schwarz criterion and the F test as guides to model selection". *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 22(5): 431-445.
- Lue, L. P., Hadman, S. T. y Vancura, A.** 2002. "Liquid chromatographic determination of amphotericin B in different pharmaceuticals". *J. AOAC Int.* 85(1): 15-9.
- Lyke, K. E., Miller, N. S., Towne, L. y Merz, W. G.** 2001. "A case of cutaneous ulcerative alternariosis: rare association with diabetes mellitus and unusual failure of itraconazole treatment". *Clin. Infect. Dis.* 32(8): 1178-1187.
- Lyman, C. A. y Walsh, T. J.** 1992. "Systematically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications". *Drugs.* 44: 9-35.
- Malcolmson, C. y Lawrence, M. J.** 1993. "A comparison of the incorporation of model steroids into non-ionic micellar and microemulsion systems". *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 141-143.
- Malcolmson, C., Dufour, A. y Banakar, U. V.** 1993. "Modelling of dissolution behaviour of controlled release systems". *S.T.P. Pharma Practiques.* 3(1): 49-58.
- Malcolmson, C., Satra, C., Kantaria, S., Sidhu, A. y Lawrence, M. J.** 1998. "Effect of oil on the level of solubilization of testosterone propionate into nonionic oil-in-water microemulsions". *J. Pharm. Sci.* 87(1): 109-116.
- Malewicz, B., Momsen, M. y Jenkin, H. M.** 1983. "Combined effect of aciclovir and amphotericin B on the replication of Pseudoarabes virus in BHK-21 cells". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 23: 119.
- Manohar, V. , Ingram, C., Gray, J., Talpur, N. A., Echard, B. W., Bagchi, D. y Preuss, H. G.** 2001. "Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*". *Mol. Cell. Biochem.* 228(1-2): 111-7.
- Martinez, A., Ferrer, S., Santos, I., Jimenez, E., Sparrowe, J., Regadera, J., De las Heras, F. G. y Gargallo-Viola, D.** 2001. "Antifungal activities of two new azasordarins, GW471552 and GW471558, in experimental models of oral and vulvovaginal candidiasis in immunosuppressed rats". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45(12): 3304-9.
- Mc Chesney, J. A. y Marquardt, J. F.** 1964. "Hypokalemic paralysis induced by amphotericin B". *J. A. M. A.* 189: 1029-1031.
- McCurdy, D. K., Frederic, M. y Elkinton, J. R.** 1968. "Renal tubular acidosis due to amphotericin B". *The New England J. Med.* 278(3): 124-131.
- Mechlinski, W., Schaffner, C. P., Ganis, P. y Avitabile, G.** 1970. "Structure and absolute configuration of the polyene macrolide amphotericin B". *Tetrahedron Letters.* 44: 3873-3876.

Medoff, G., Comfort, M. y Kobayashi, G. S. 1971. "Synergistic action of amphotericin B and 5-fluorocytosine against yeast-like organisms". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138: 571-574.

Medoff, G., Kobayashi, G. S., Kwan, C. N., Schlessinger, D. y Venkov P. 1972. "Potentiation of rifampin and 5-fluorocytosine as antifungal antibiotics by amphotericin B". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69: 196-199.

Mehta, J., Kelsey, S., Chu, P., Powles, R., Hazel, D., Riley, U., Evans, C., Newland, A., Treleaven, J. y Singhal, S. 1997. "Amphotericin B lipid complex (ABLCL) for the treatment of confirmed or presumed fungal infections in immunocompromised patients with hematologic malignancies". *Bone Marrow Transplant.* 20(1): 39-43.

Meletiadis, J., Meis, J. F., Mouton, J. W., Rodriguez-Tudela, J. L., Donnelly, J. P. y Verweij, P. E. 2002. "In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46(1): 62-8.

Meng, W. y Jin, W. Z. 1997. "Structure determination of new antifungal antibiotics, polaramycins A and B". *Yao. Xue. Xue. Bao.* 32(5): 352-6.

Meyer, R. D. 1992. "Current role of therapy with Amphotericin B". *Clin. Infect. Dis.* 14(Suppl. 1): S154-S160.

Mikami, Y., Komaki, H., Imai, T., Yazawa, K., Nemoto, A., Tanaka, Y. y Graefe, U. 2000. "A new antifungal macrolide component, brasinolide B, produced by *Nocardia brasiliensis*". *J. Antibiot. (Tokyo).* 53(1): 70-4.

Miller, R. P. y Bates, J. H. 1969. "Amphotericin B toxicity. A follow-up report of 53 patients". *Annals of Internal Medicine.* 71: 1089-1095.

Mills, W., Chopra, R., Linch, D. C. y Goldstone, A. H. 1994. "Liposomal amphotericin B in the treatment of fungal infections in neutropenic patients: a single center experience of 133 episodes in 116 patients". *Br. J. Haematol.* 86: 754-760.

Mitchell, D. 1981. *J. Chem. Soc. Faraday Transactions.* 77: 601.

Moreno, M. A., Frutos, P. y Ballesteros, M. P. 1998. "Extraction and liquid-chromatographic determination of amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsions". *Chromatographia.* 48: 803-806.

Moreno, M. A., Frutos, P. y Ballesteros, M. P. 2001. "Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for Amphotericin B". *Pharm. Res.* 18(3): 344-351.

Moreno, M., Frutos, P., Ballesteros, M. P., Lastres, J. L. y Castro, D. 2000. "Release of nortriptyline hydrochloride from oil-water microemulsions". *Chem. Pharm. Bull.* 48(11): 1623-1627.

Morgan, D. J., Ching, M. S., Raymond, K., Bury, R. W., Mashford, M. L., et al. 1983. "Elimination of amphotericin B in impaired renal function". *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 34: 248-253.

- Mota-Miranda, A., Gomes, H., Marques, R., et al.** 1994. "Liposomal amphotericin B in the treatment of opportunistic fungal infections". *Rev. Esp. Quimioter.* 7: 146-149.
- Mukhopadhyay, T., Nadkarni, S. R., Bhat, R. G., Gupte, S. V., Ganguli, B. N., Petry, S. y Kogler, H.** 1999. "Mathemycin B, a new antifungal macrolactone from actinomycete species HIL Y-8620959". *J. Nat. Prod.* 62(6): 889-90.
- Muller, E. A., Kovarik, J. M., Uresin, Y., Preisig-Fluckiger, S. S., Hensel, S., Lucker, P. W. y Holt, B.** 1997. "Optimizing the absorption of valsopodar, a P-glycoprotein modulator. Part I: Selecting an oral formulation and exploring its clinical pharmacokinetics/dynamics". *J. Clin. Pharmacol.* 37: 1001-1008.
- Muller, F. M., Kurzai, O., Hacker, J., Frosch, M. y Muhlschlegel, F.** 2001. "Effect of the growth medium on the in vitro antifungal activity of micafungin (FK-463) against isolates of *Candida dubliniensis*". *J. Antimicrob. Chemother.* 48(5): 713-5.
- Murdan, S., Gregoriadis, G. y Florence, A. T.** 1999. "Novel sorbitan monostearate organogels". *J. Pharm. Sci.* 88: 608-614.
- Nadkarni, S. R., Mukhopadhyay, T., Bhat, R. G., Gupte, S. V. y Sachse, B.** 1998. "Mathemycin A, a new antifungal macrolactone from Actinomycete sp. HIL Y-8620959. I. Fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities". *J. Antibiot. (Tokio)*. 51(6): 582-5.
- Narasimhan, M. L., Damsz, B., Coca, M. A., Ibeas, J. I., Yun, D. J., Pardo, J. M., Hasegawa, P. M. y Bressan, R. A.** 2001. "A plant defense response effector induces microbial apoptosis". *Mol. Cell.* 8(4): 921-30.
- Ng, T. B., Au, T. K., Lam, T. L., Ye, X. Y. y Wan, D. C.** 2002. "Inhibitory effects of antifungal proteins on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, protease and integrase". *Life. Sci.* 70(8): 927-35.
- Nielsen, K. K., Nielsen, J. E., Madrid, S. M. y Mikkelsen, J. D.** 1997. "Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves". *Plant. Physiol.* 113(1): 83-91.
- Nielsen, T. H., Thrane, C., Christophersen, C., Anthoni, U. y Sorensen, J.** 2000. "Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin- a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578". *J. Appl. Microbiol.* 89(6): 992-1001.
- Nilius, A. M., Raney, P. M., Hensey-Rudolff, D. M., Wang, W., Li, Q. y Flamm, R. K.** 2000. "In vitro activity of A-192411.29, a novel antifungal lipopeptide". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44(5): 1242-6.
- Nose, H., Seki, A., Yaguchi, T., Hosoya, A., Sasaki, T., Hoshiko, S. y Shomura, T.** 2000. "PF 1163 A and B, new antifungal antibiotics produced by *Penicillium* sp. I. Taxonomy of producing strain, fermentation, isolation and biological activities". *J. Antibiot. (Tokio)*. 53(1): 33-7.

Noskin, G., Pietrelli, L., Coffey, G., Gurwith, M. y Liang, L. J. 1998. "Amphotericin B colloidal dispersion for treatment of candidemia in immunocompromised patients". *Clin. Infect. Dis.* 26(2): 461-467.

Noskin, G., Pietrelli, L., Gurwith, M. y Bowden, R. 1999. "Treatment of invasive fungal infections with amphotericin B colloidal dispersion in bone marrow transplant recipients". *Bone. Marrow. Transplant.* 23(7): 697-703.

Nowoczyn, V., Ritter, J., Boos, J., et al. 1992. "Liposomal amphotericin B (AmBisome) in neutropenic children with hematological malignancies and systemic fungal infections". *Med. Pediatr. Oncol.* 20(5): 376.

Offringa, J. C., Plekkenpol, R. y Crommelin, D. J. 1987. "A differential scanning calorimetry study of the thermal behavior of water-dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures at subzero temperatures: effects of water content, surface charge, and cholesterol". *J Pharm Sci.* 76(10): 821-4.

O'Hagan, D. T. 1998. "Recent advances in vaccine adjuvants for systemic and mucosal administration". *J. Pharm. Pharmacol.* 50(1): 1-10.

Okada, H., Kamiya, S., Shiina, Y., Suwa, H., Nagashima, M., Nakajima, S. et al. 1998. "BE-31405, a new antifungal antibiotic produced by *Penicillium minioluteum*. I. Description of producing organism, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties". *J. Antibiot. (Tokio).* 51(12): 1081-6.

Olsen, S. J., Swerdel, M. R., Blue, B., Clark, J. M. y Bonner, D. P. 1991. "Tissue distribution of amphotericin B lipid complex in laboratory animals". *J. Pharmacol.* 43: 831-835.

Oppenheim, B. A., Herbrecht, R. y Kusne, S. 1995. "The safety and efficacy of amphotericin B colloidal dispersion in the treatment of invasive mycosis". *Clin. Infect. Dis.* 21(5):1145-1153.

Oravcova, E., Mistrik, M., Sakalova, A., Drgona, L., Kollar, T., Helpianska, L. et al. 1995. "Amphotericin B lipid complex to treat invasive fungal infections in cancer patients: report of efficacy and safety in 20 patients". *Chemotherapy.* 41(6): 473-476.

Otsubo, T., Maruyama, K., Maesaki, S., Miyazaki, Y., Tanaka, E., Takizawa, T., Moribe, K., Tomono, K., Tashiro, T. y Kohno, S. 1998. "Long-circulating immunoliposomal amphotericin B against invasive pulmonary aspergillosis in mice". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42(1): 40-44.

Owen, A. J., Yiy, S. H. y Sarkahian, A. 1992. "Convertible microemulsion formulations" PCT Patent Application WO 92/18147, 29 octubre.

Page, C., Curtis, M. J., Sutter, M. C., Walker, M. J. A. y Hoffman, B. B. 1998. "Farmacología integrada". Harcourt Brace de España, S. A.

Pahls, S. y Schaffner, A. 1994. "Comparison of the activity of free and liposomal amphotericin B in vitro and in a model of systemic and localized murine candidiasis". *J. Infect. Dis.* 169: 1057-1061.

Palmer, S. M., Drew, R. H., Whitehouse, J. D., Tapson, V. F., Davis, R. D., McConnell, R. R., Kanj, S. S. y Parfect, J. R. 2001. "Safety of aerosolized amphotericin B lipid complex in lung transplant recipients". *Transplantation*. 72(3): 545-548.

Papadimitriou, J. M. y Ashman, R. B. 1986. "The pathogenesis of acute systemic candidiasis in a susceptible inbred mouse strain". *J. Pathol.* 150: 257-265.

Park, K. M. y Kim, C. K. 1999. "Preparation and evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsions for parenteral delivery". *Int. J. Pharm.* 181: 173-179.

Park, K. M., Lee, M. K., Hwang, K. J. y Kim, C. K. 1999. "Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofen by the spontaneous emulsification process". *Int. J. Pharm.* 183(2): 145-154.

Patel, N., Marlow, M. y Lawrence, M. J. 1998. "Microemulsions: a novel pMD1 formulation". In: *Drug Delivery to the Lungs IX*, London, The Aerosol Society, Bristol. 160-163.

Perkins, W. R., Minchey, S. R., Boni, L. T., Swenson, C. E., Popescu, M. C., Paternack, R. F. y Janoff, A. S. 1992. "Amphotericin B phospholipid interactions responsible for reduced mammalian cell toxicities". *Biochem. Biophys. Acta.* 1107: 271-282.

Petraitiene, R., Petraitis, V., Groll, A. H., Sein, T., Schaufele, R. L., Francesconi, A., Bacher, J., Avila, N. A. y Walsh, T. J. 2002. "Antifungal efficacy of capofungin (MK_0991) in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits: pharmacokinetics, drug disposition, and relationship to galactomannan antigenemia". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46(1): 12-23.

Pfaller, M. A., Jones, R. N., Doern, G. V., Sader, H. S., Hollis, R. J. y Messer, S. A. 1998. "International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program". The SENTRY Participant Group. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1886-1889.

Pineros, I. 2000. "Desarrollo galénico de formulaciones parenterales de clonixinato de lisina". Tesis Doctoral. UCM.

Prentice, H. G., Hahn, I. M., Herbrecht, R., et al. 1997. "A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients". *Br. J. Haematol.* 98:711-718.

Prince, L. M. 1967. *J. Colloid. Interface Sci.* 23: 165.

Proffitt, R. T., Satorius, A., Chiang, S. M., Sullivan, L. y Adler-Moore, J. P. 1991. "Pharmacology and toxicology of a liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in rodents". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 28(Suppl. B): 49-61.

Quindos, G., Carrillo-Muñoz, A. J., Arevalo, M. P., Salgado, J., Alonso-Vargas, R. et al. 2000. "In vitro susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents". *Chemotherapy.* 46(6): 395-401.

Radomska, A. y Dobrucki R. 2000. "The use of some ingredients for microemulsion preparation containing retinol and its esters". *Int. J. Pharm.* 196: 131-134.

Ragarajan, M. y Zatz, J. L. 2001. "Effect of formulation on the delivery and metabolism of alpha-tocopherylacetate". *J. Cosmet. Sci.* 52(4): 225-236.

Ralph, E. D., Khazindar, A. M., Barber, K. R. y Grant, C. W. M. 1991. "Comparative in vitro effects of liposomal amphotericin B, amphotericin B-deoxycholate, and free amphotericin B against fungal strains determined by using MIC and minimal lethal concentration susceptibility studies and time-kill curves". *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 188-191.

Ramaswamy, M., Peteherych, K. D., Kennedy, A. L. y Wasan, K. M. 2001. "Amphotericin B lipid complex or amphotericin B multiple-dose administration to rabbits with elevated plasma cholesterol levels: pharmacokinetics in plasma and blood, plasma lipoprotein levels, distribution in tissues, and renal toxicities". *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(4): 1184-1191.

Rapp, R. P., Gubbins, P. O. y Evans, M. E. 1997. "Amphotericin B lipid complex". *Ann. Pharmacother.* 31: 1174-1186.

Red Book and drug topics. 2000. Medical Economics Company, Inc. Montvale, NJ.

Reynolds, E. S., Tomkiewicz, Z. M. y Dammin, G. J. 1963. "The renal lesion related to amphotericin B treatment for coccidioidomycosis". *Med. Clin. N. Amer.* 47: 1149.

Reynolds, J., y Parfitt, K. 1996. "Amphotericin", p. 398-402. *In* Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 31st ed. Royal pharmaceutical Society, London.

Rhoades, E. R., Ginn, H. E., Muchmore, H. G., Smith, W. O. y Hammarsten, J. F. "Effect of amphotericin B upon renal function in man". *In* Antimicrobial Agents Annual, 1960. P. Gray, B. Tabekin and S. G. Bradley (ed.), New York: plenum press, 1961. Vol. 1, Society for Industrial Microbiology. 539-542.

Richardson, M. D. y Warnock, D. 1997. "Fungal infections. Diagnosis and management" Segunda edición. Blackwell Science Ltd. 20-58.

Richardson, S. E., Bannatyne, R. M., Summerbell, R. C., Milliken, J., Gold, R. y Weitzman, S. S. 1988. "Disseminated fusarial infection in the immunocompromised host". *Rev. Infect. Dis.* 10: 1171-1181.

Riegelman, S., Loo, J. C. K. y Rowland, M. 1968. "Concepts of volume of distribution and possible errors in evaluation of this parameter". *Science.* 57: 128-133.

Riegelman, S., Loo, J. C. K. y Rowland, M. 1968. "Shortcomings in pharmacokinetic analysis by conceiving the body to exhibit properties of a single compartment". *J. Pharm. Sci.* 57: 117-123.

Ringden, O., Andstrom, E., Remberger, M., Svahn, B. M. y Tollemar, J. 1994. "Safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) in 187 transplant recipients treated with cyclosporin" *Bone Marrow Transplant* 14 Suppl 5: S10-4.

- Ringden, O., Meunier, F., Tollemar, J., Ricci, P., Tura, S., Kuse, E., Viviani, M. A., Gorin, N. C., Klastersky, J., Fenaux, P., Prentice, H. G. y Ksionski, G.** 1991. "Efficacy of amphotericin B encapsulated in liposomes (AmBisome) in the treatment of invasive fungal infections in immunocompromised patients". *J. Antimicrob. Chemother.* 28(Suppl. B): 73-82.
- Ringden, O., Tollemar, J., Dahllöf, G., et al.** 1994. "High cure rate of invasive fungal infections in immunocompromised children using AmBisome". *Transplant. Proc.* 26: 175-177.
- Ritschel, W. A.** 1993. "Microemulsions for improved peptide absorption from the gastrointestinal tract". *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 13: 205-220.
- Robbie, G., Wu, T. y Chiou, W. L.** 1999. "Poor and unusually prolonged oral absorption of amphotericin B in rats". *Pharm. Res.* 16(3): 455-458.
- Roberts, J., Schock, K., Marino, S. y Andriole, V. T.** 2000. "Efficacies of two new antifungal agents, the triazole ravuconazole and the echinocandin LY-303366, in an experimental model of invasive aspergillosis". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44(12): 3381-8.
- Robinson, R. F. y Nahata, M. C.** 1999. "A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B". *J. Clin. Pharm. Ther.* 24: 249-257.
- Rosano, H. L. y Clause, M.** 1987. *Microemulsion systems. Surfactant Science Series. Vol 24.* New York. Marcel Dekker.
- Rosano, H. L., Cavallo, J. L., Chang, D. L. y Whittam, J. H.** 1988. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 39: 201-209.
- Ruckenstein, E.** 1975. "Stability, phase equilibria and interfacial free energy in microemulsions". En *Micellization, solubilization and microemulsions.* (Mittal, K. L., Ed). New York. Plenum Press, 2: 755-778.
- Ruijgrok, E. J., Vulto, A. G. y Van Etten, E. W.** 2000. "Aerosol delivery of amphotericin B desoxycholate (Fungizone) and liposomal amphotericin B (AmBisome): aerosol characteristics and in vivo amphotericin B deposition in rats". *J. Pharm. Pharmacol.* 52(6): 619-627.
- Russo, R., Nigro, L. C., Minniti, S., et al.** 1996. "Visceral leishmaniasis in HIV infected patients: treatment with high dose liposomal amphotericin B (AmBisome)". *J. Infect.* 32: 133-137.
- Ryley, J. F., McGregor, S., Lister, S. C. y Jackson, K. P.** 1988. "Kidney function in experimental systemic candidiasis of mice". *Mycoses.* 31: 203-207.
- Ryu, G., Choi, W. C., Hwang, S., Yeo, W. H., Lee, C. S. y Kim, S. K.** 1999. "Tetrin C, a new glycosylated polyene macrolide antibiotic produced by *Streptomyces* sp.". *J. Nat. Prod.* 63(6): 917-9.
- Sabra, R., Takahashi, R., Branch, A. y Badr, K.** 1990. "mechanism of amphotericin B-induced reduction of glomerular filtration rate". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 34-37.

Saenz, R. E., Brown, W. D. y Sanders, C. V. 2001. "Allergic bronchopulmonary disease caused by *Bipolaris hawaiiensis* presenting as necrotizing pneumonia: case report and review of literature". *Am. J. Med. Sci.* 321(3): 209-212.

Saint Ruth, H., Attwood, D., Ktistis, G. y Taylor, C. J. 1995. "Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions". *Int. J. Pharm.* 116: 253-261.

Salama, A., Burger, M. y Mueller-Eckhardt, C. 1989. "Acute immune hemolysis induced by a degradation product of amphotericin B". *Blut.* 58(2): 59-61.

Sánchez-Brunete, J. A., Torrado, S., Bolas, F., Alunda, J. M. y Torrado, J. J. 2001. "Validación de un nuevo método para la cuantificación de anfotericina B por cromatografía líquida de alta eficacia a 380 nm". V Congreso de la SEFIG, Valencia 4-6 febrero.

Sanders, S. W., Buchi, K. N., Goddard, M. S., Lang, J. K. y Tolman, K. G. 1991. "Single-dose pharmacokinetics and tolerance of a cholesteryl sulfate complex of amphotericin B administered to healthy volunteers". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 35(6): 1029-34.

Sandler, E. S., Mustafa, M. M., Tkaczewski, I., Graham, M. L., Morrison, V. A., Green, M., Trigg, M., et al. 2000. "Use of amphotericin B colloidal dispersion in children". *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 22(3): 242-246.

Santangelo, R., Paderu, P., Delmas, G., Chen, Z. W., Mannino, R., Zarif, L. y Perlin, D. S. 2000. "Efficacy of oral cochleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44(9): 2356-2360.

Sata, N. U., Matsunaga, S., Fusetani, N. y van Soest, R. W. 1999. "Aurantiosides D, E and F: new antifungal tetramic acid glycosides from the marine sponge *Siliquaraspongia japonica*". *J. Nat. Prod.* 62(7): 969-71.

Sawaya, B., Briggs, J. y Schnermann, J. 1995. "Amphotericin B nephrotoxicity: the adverse consequence of altered membrane properties", *J. Am. Soc. Nephrol.* 6: 156-164.

Schmalfuß, U., Neubert, R. y Wohlrab, W. 1997. "Modification of drug penetration into human skin using microemulsions". *J. Control. Rel.* 46: 279-285.

Schroeder, F., Holland, J. F. y Bieber, L. L. 1971. "Fluorometric evidence for the binding of cholesterol to the filipin complex". *J. Antibiot. (Tokyo).* 24: 846-849.

Schulman, J. H., Stoeckenius, W. y Prince, L. M. 1959. "Mechanism of formation and structure of microemulsion by electron microscopy". *J. Phys. Chem.* 63: 1677-1680.

Seabury, J. H. 1961. "Experience with amphotericin B". *Chemotherapia.* 3: 81.

Seaman, J., Boer, C., Wilkinson, R., et al. 1995. "Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of complicated kala-azar under field conditions". *Clin. Infect. Dis.* 21: 188-193.

Sequus Pharmaceuticals, 1998. Inc: Amphotericin B cholesteryl sulfate complex for injection. In, Physicians Desk Reference. Fifty-second edition. Montvale. NJ: Medical Economics Data. 2764-2768.

Shao, F., Hu, Z., Xiong, Y. M., Huang, Q. Z., Wang, C. G., Zhu, R. H. y Wang, D. C. 1999. "A new antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*: characterization, amino acid sequence and CDNA cloning". *Biochim. Biophys. Acta.* 1430(2): 262-8.

Shargel, L. y A. Yu. 1999. "Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics". In Appleton and Lange (ed.).

Shargel, L., Yu, A., et al. 1999. "Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics". 4^aed. Ed. Appleton and Lange. EEUU.

Sharkey, P. K., Graybill, J. R., Johnson, E. S., Hausrath, S. G. et al. 1996. "Amphotericin B lipid complex compared with amphotericin B in the treatment of cryptococcal meningitis in patients with AIDS". *Clin. Infect. Dis.* 22(2): 329-330.

Sharkey, P. K., Lipke, R., Renteria, A., Gulgini, J., Catanzano, A. M., Diaz, M. et al. 1991. "Amphotericin B lipid complex (ABLC) in the treatment of coccidioidomycosis (abstract)". In: Program and Abstracts on the 31st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL. September 29-October 2. 222.

Shinoda, K. 1968. "The comparison between the PIT system and the HLB-value system to emulsifier selection". V Congreso Internacional Detergencia, en Barcelona. Barcelona. 275-283.

Shinoda, K. y Friberg, S. E. 1986. "Emulsions and solubilization". New York. John Wiley & Sons.

Shinoda, K. y Lindman, B. 1987. "Organised surfactant systems: microemulsions". *Langmuir.* 3:135-149.

Shinoda, K., Araki, M., Sadaghiani, A., Khan, A. y Lindman, B. 1991. "Lecithin-based microemulsions: phase behaviour and microstructure". *J. Phys. Chem.* 95: 989-993.

Simon, S. A., Fink, C. A., Kenworthy, A. K. y McIntosh, T. J. 1991. "The hydration pressure between lipid bilayers. Comparison of measurements using x-ray diffraction and calorimetry". *Biophys J.* 59(3): 538-46.

Sohail, M. A., Al Khabori, M., Hyder, J. y Verma, A. 2001. "Acute fulminant sinusitis: clinical presentation, radiological findings and treatment". *Acta. Trop.* 80(2): 177-185.

Sommerville, M. L., Cain, J. B. y Johnson, C. S. 2000. "Lecithin inverse microemulsions for the pulmonary delivery of polar compounds utilizing dimethylether and propane as propellants". *Pharm. Dev. Technol.* 5(2): 219-230.

Sorensen, K. N., Wanstrom, A. A., Allen, S. D. y Takemoto, J. Y. 1998. "Efficacy of syringomycin E in a murine model of vaginal candidiasis". *J. Antibiot. (Tokio).* 51(8): 743-9.

- Srivastava, S. K., Srivastava, S. D. y Chouksey, B. K.** 2001. "New antifungal constituents from *Terminalia alata*". *Fitoterapia*. 72(2): 106-12.
- Storm, G. y van Etten, E.** 1997. "Biopharmaceutical aspects of lipid formulations of amphotericin B". *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16(1): 64-73.
- Storm, G. y Woodle, M. C.** 1998. In *Long circulating liposomes: Old drugs, new therapeutics*; Woodle, M., Storm, G., Eds.; Springer-Verlag: New York, 3-16.
- Sud, I. J. y Feingold, D. S.** 1983. "Effect of ketoconazole on the fungicidal action of amphotericin B in *Candida albicans*". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 23(1): 185-7.
- Sundar, S., Agrawal, G., Rai, M., Makharia, M. K. y Murray, H. W.** 2001. "Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposomal amphotericin B: randomized trial". *BMJ*. 323(7310): 419-422.
- Sundar, S., Agrawal, N. K., Sinha, P. R., Horwith, G. S. y Murray, H. W.** 1997. "Short-course, low-dose amphotericin B lipid complex therapy for visceral leishmaniasis unresponsive to antimony". *Ann. Intern. Med.* 127(2): 133-137.
- Sundar, S., Goyal, A. K., Mandal, A. K., Makharia, M. K., Singh, V. P. y Murray, H. W.** 2001. "Amphotericin B lipid complex in the management of antimony unresponsive Indian visceral leishmaniasis". *J. Assoc. Physicians. India.* 47(2): 186-188.
- Sundar, S., Goyal, A. K., More, D. K., Singh, V. P. y Murray, H. W.** 1998. "Treatment of antimony-unresponsive Indian visceral leishmaniasis with ultra-short courses of amphotericin B-lipid complex". *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92(7): 755-764.
- Suzuki, Y., Takahashi, H., Esumi, Y., Arie, T., Morita, T., Koshino, H., Uzawa, J., Uramoto, M. y Yamaguchi, I.** 2000. "Haematocin, a new antifungal diketopiperazine produced by *Nectria haematococca* Berk. Et Br. (88070a-1) causing nectria blight disease on ornamental plants". *J. Antibiot. (Tokio)*. 53(1): 45-9.
- Swarbrick, J. y Boylan, C.** 1994. "Microemulsions". Vol 9 375. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Marcel Dekker: New York.
- Tan, R. X., Lu, H., Wolfender, J. L., Yu, T. T., Zheng, W. F., Yang, L., Gafner, S. y Hostettmann, K.** 1999. "Mono- and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species". *Planta. Med.* 65(1): 64-7.
- Thakur, C. P.** 2001. "A single high dose treatment of kala-azar with AmBisome (amphotericin lipid complex): a pilot study". *Int. J. Antimicrob. Agents.* 17(1): 67-70.
- Thakur, C. P., Pandey, A. K., Sinha, G. P. et al.** 1996. "Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome Rm) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90: 319-322.
- Thaler, M., Pastakia, B., Shawker, T. H., O'Leary, T. y Pizzo, P. A.** 1988. "Hepatic candidiasis in cancer patients: the evolving picture of the syndrome". *Ann. Intern. Med.* 108: 88-100.

The Liposome Company, 1988. Inc: Abelcet, amphotericin B lipid complex injection. In, Physicians Desk Reference. Fifty-second edition. Montvale, NJ: Medical Economics Data. 1516-1518.

Tillack, T. W. y Kinsky, S. C. 1973. "A freeze-etch study of the effects of filipin on liposomes and human erythrocyte membranes". *Biochim. Biophys. Acta.* 323: 43-54.

Timmers, G. J., Zweegman, S., Simoons-Smit, A. M., van Loenen, A. C., Touw, D. y Huijgens, P. C. 2000. "Amphotericin B colloidal dispersion (Amphocil) vs fluconazole for the prevention of fungal infections in neutropenic patients: data of a prematurely stopped clinical trial". *Bone. Marrow. Transplant.* 25(8): 879-884.

Tollemar, J., Höckerstedt, K., Ericzon, B. G., et al. 1995. "Prophylaxis with liposomal amphotericin B (AmBisome) prevents fungal infections in liver transplant recipients: long term results of a randomized, placebo-controlled trial". *Transplant. Proc.* 27: 1195-1198.

Tollemar, J., Ringden, O., Andersson, S., et al. 1993. "Randomized double-blind study of liposomal amphotericin B (AmBisome) prophylaxis of invasive fungal infections in bone marrow transplant recipients". *Bone. Marrow. Transplant.* 12: 577-582.

Trotta, M. 1999. "Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions" *J. Control. Rel.* 60: 399-405.

Trotta, M., Gallarate, M. Patterino, F. y Carlotti, M. E. 1999. "Investigation of the phase behaviour of systems containing lecithin and 2-acyl lysolecithin derivatives". *Int. J. Pharm.* 190: 83-89.

Trotta, M., Gasco, M. R. y Carlotti, M. E. 1990. "Study on an o/w microemulsion carrying diazepam". *Acta Technologiae et legis Medicamenta.* 1: 137-148.

Trotta, M., Gasco, M. R. y Pattarino, F. 1990. "Diffusion of steroid hormones from O/W-microemulsions: influence of the cosurfactant". *Act. Pharm. Technol.* 36: 226-231.

Trotta, M., Gasco, M. R., Caputo, O. y Sancin, P. 1994. "Transcutaneous diffusion of haematoporphyrin in photodynamic therapy in vitro release from microemulsions" *S. T. P. Pharma. Sci.* 4(2): 150-154.

Trotta, M., Morel, S. y Gasco M. R. 1997. "Effect of oil phase composition on the skin permeation of felodipine from o/w microemulsions". *Pharmazie.* 52: 50-53.

Trotta, M., Ugazio, E. y Gasco, M. R. 1995. "Pseudo-ternary phase diagrams of lecithin-based microemulsions: Influence of monoalkylphosphates". *J. Pharm. Pharmacol.* 47: 451-454.

Tsukamoto, S., Matsunaga, S., Fusetani, N. y van-Soest, R. W. 1998. "Acanthosterol sulfates A-J: ten new antifungal steroidal sulfates from a marine sponge *Acanthodendrilla* sp.". *J. Nat. Prod.* 61(11): 1374-8.

Ugur, U. A., Avcu, F., Catin, T., Beyan, C., Kaptan, K., Nazaroglu, N. K. y Yalcin, A. 2002. "Spironolactone: is it a novel drug for the prevention of amphotericin B-related hypokalemia in cancer patients?". *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 57(11): 771-3.

USP DI. Drug information for the health care professional. 2000. 20th Edition. Micromedex. The United States Pharmacopeial Convention, Inc.

Van Burik, J. A., Myerson, D., Schreckhise, R. W. y Bowden, R. A. 1998. "Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens". *J. Clin. Microbiol.* 36: 1169-1175.

VanOmmen, R. A. 1974. "Untoward effects of antimicrobial agents on major organ systems". *Med. Clin. North. Am.* 58(3): 465-478.

Verkleij, A. J., De Kruijff, B., Gerritsen, W. F., Demel, R. A., Van Deenen, L. L. M. y Ververgaert, P. H. J. 1973. "Freeze-etch electron microscopy of erythrocytes, *Acholeplasma laidlawii* cells and liposomal membranes after the action of filipin and amphotericin B". *Biochim. Biophys. Acta.* 291: 577-581.

Verweij, P. E., Donnelly, J. P., Kullberg, B. J., Meis, J. F. y de Pauw, B. E. 1994. "Amphotericin B versus amphotericin B plus 5-flucytosine: poor results in the treatment of proven systemic mycoses in neutropenic patients". *Infection* 22: 81-85.

Voigt, R. y Bornschein, M. 1982. "Tratado de Tecnología Farmacéutica". Editorial Acribia, Zaragoza,

Von Corswant, C. V., Thoren, P. y Engstrom, S. 1998. "Triglyceride-based microemulsion for intravenous administration of sparingly soluble substances". *J. Pharm. Sci.* 87(2): 200-208.

Wali, Y. A., al Lamki, Z., al Kindi, H., Taqi, A. M., Shah, W., Soliman, H., et al. 2001. "case report. Successful outcome of invasive nasal sinus zygomycosis in a child with relapsed acute lymphoblastic leukaemia due to liposomal amphotericin B". *Mycoses* 44(5): 195-199.

Walsh, T. J., Bekersky, I. y Yeldandi, V. 1995. "Pharmacokinetics of AmBisome in persistently febrile neutropenic patients receiving empirical antifungal therapy". In 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; American Society for Microbiology, Washington, DC: San Francisco, CA. A13.

Walsh, T. J., Finberg, R. W., Arndt, C., Hiemenz, J., Schwartz, C., Bodensteiner, D., Pappas, P., et al. 1999. "Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia". *New. Engl. J. Med.* 340: 764-771.

Walsh, T. J., Hiemenz, J. W., Seibel, N. L. y Anaissie, E. J. 1994. "Amphotericin B lipid complex in the treatment of 228 cases of invasive mycosis (abstract)". In: Program and Abstracts on the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Orlando, FL. October 4-7. 247.

Walsh, T. J., Hiemenz, J. W., Seibel, N. L., Perfect, J. R., Horwith, G., Lee, L., Silber, J. L., DiNubile, M. J. et al. 1998. "Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases". *Clin. Infect. Dis.* 26(6): 1383-1396.

Walsh, T. J., Yeldandi, V., McEvory, M., Gonzales, C., Chanok, S. y Friefeld, A., et al. 1998. "Safety, tolerance, and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal

formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42(9): 2391-2398.

Wang, H., Gloer, K. B., Gloer, J. B., Scott, J. A. y Malloch, D. 1997. "Anserinones A and B: new antifungal and antibacterial benzoquinones from the coprophilous fungus *Podospora anserina*". *J. Nat. Prod.* 60(6): 629-31.

Warisnoicharoen, W., Lansley, A. B. y Lawrence, M. J. 2000. "Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour". *Int. J. Pharm.* 198: 7-27.

Wasan, K. M., Kennedy, A. L., Cassidy, S. M., Ramaswamy, M., Holtorf, L., Chou, J. w. y Pritchard, P. H. 1998. "Pharmacokinetics, distribution in serum lipoproteins and tissues, and renal toxicities of amphotericin B and amphotericin B lipid complex in a hypercholesterolemic rabbit model: single-dose studies". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42(12): 3146-3152.

Watanabe, S., Hirai, H., Kato, Y., Nishida, H., Saito, T., Yoshikawa, N., Parkinson, T. y Kojima, Y. 2001. "CJ-19784, a new antifungal agent from a fungus, *Acanthostigmella* sp.". *J. Antibiot (Tokio)*. 54(12): 1031-5.

Wertlake, P. T., Butler, W. T., Hill, G. J., et al. 1963. "Nephrotoxic tubular damage and calcium deposition following amphotericin B therapy". *Amer. J. Path.* 43: 449-457.

White, M. H., Anaissie, E. J., Kusne, S., Wingard, J. R., Hiemenz, J. W., Cantor, A., et al. 1997. "Amphotericin B colloidal dispersion vs. amphotericin B as therapy for invasive aspergillosis". *Clin. Infect. Dis.* 24(4): 635-642.

White, M. H., Bowden, R. A., Sandler, E. S. et al. 1996. "Amphotericin B colloidal dispersion (ABCD) vs. amphotericin B (AmB) in the empiric treatment of febrile neutropenic patients". *Blood.* 88(Suppl. 10):302^a.

White, M. H., Bowden, R. A., Sandler, E. S., Graham, M. L., Noskin, G. A., Wingard, J. R., Goldman, M., van Burik, J. A. et al. 1998. "Randomized, double-blind clinical trial of amphotericin B colloidal dispersion vs. amphotericin B in the empirical treatment of fever and neutropenia". *Clin. Infect. Dis.* 27(2): 296-302.

Wingard, J. R., White, M. H., Anaissie, E., Raffali, J., Goodman, J. y Arrieta, A. 2000. "A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia". *Clin. Infect. Dis.* 31(5):1155-1163.

Wolfensohn S. y M. Lloyd. 1998. "Handbook of laboratory animal management and welfare". 2nd edition. Veterinary services, university of Oxford. Blackwell Science Ltd. Small laboratory animals pp 169.

Wong-Beringer, A., Jacobs, R. A. y Guglielmo, B. J. et al. 1998. "Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities". *Clin. Infect. Dis.* 27: 603.618.

Yadava, R. N. 2001. "A new biologically active triterpenoid saponin from the leaves of *Lepidagathis hyalina* Nees". *Nat. Prod. Lett.* 15(5): 315-22.

Yates, J. L., Atay, M. N., Langeluttig, H. V., Brasher, C. A. y Furcolow, M. L. 1960. "Experience with amphotericin in the therapy of histoplasmosis". *Dis. Chest.* 37: 144.

Ye, X. Y. y Ng, T. B. 2002. "Isolation of a new cyclophilin-like protein from chickpeas with mitogenic, antifungal and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities". *Life. Sci.* 70(10): 1129-38.

Young D. S. 2000. "Effects of Drugs on clinical Laboratory tests". Fifth edition. AACCC Press. 2:3,1-3,943.

Yu, B. G., Okano, T., Kataoka, K. y Kwon, G. 1998. "Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B". *J. Control. Release.* 53(1-3): 131-136.

Zager, R. A., Bredl, C. R. y Schimpf, B. A.. 1992. "Direct amphotericin B-mediated tubular toxicity: assessment of selected cytoprotective agents". *Kidney Intern.* 41: 1588-1594.

Zhang, D. y Miller, M. J. 1999. "Polyoxins and nikkomycins: progress in synthetic and biological studies". *Curr. Pharm. Des.* 5(2): 73-99.